

Aus der Klinik für Innere Medizin, Schwerpunkt Kardiologie
(Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. B. Maisch)
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Verhaltensauffälligkeiten transgener Mäuse
mit defizienter kooperativer DNA-Bindung
des Transkriptionsfaktors STAT1**



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Jan Robert Haussmann aus Göttingen

Marburg, 2013

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 22.3.2013

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. Matthias Rothmund

Referent: Prof. Dr. mult. Thomas Meyer

Korreferent: Prof. Dr. Alexander Brehm

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	7
1.1 DIE ZYTOKIN-HYPOTHESE DER DEPRESSION	7
1.2 EINFÜHRUNG IN DIE INTERFERON- γ -SIGNALTRANSDUKTION	14
1.3 ENDOTOXIN-WIRKUNG UND VERHALTEN	18
1.4 TIERMODELLE DER DEPRESSION	19
1.5 ZIELE DER ARBEIT	22
2. MATERIAL UND METHODEN	24
2.1 MATERIALIEN ZUR GENOTYPISIERUNG	24
2.2 VERBRAUCHSMATERIALIEN	26
2.3 VERWENDETE GERÄTE	26
2.4 FIBROBLASTEN-STIMULATION	28
2.5 EXTRAKTION GENOMISCHER DNA	28
2.6 POLYMERASEKETTENREAKTION	29
2.7 RESTRIKTIONSENDONUKLEASENVERDAU	30
2.8 AGAROSE-GELELEKTROPHORESE	31
2.9 PHOTOMETRISCHE MESSUNG DER DNA-KONZENTRATION	31
2.10 PROTEINEXTRAKTION	32
2.11 KOMPETITIONS-GELSHIFT-ASSAY	32
2.12 REVERSE-TRANSKRIPTASE PCR	34
2.13 TRANSGENE TESTMÄUSE	34
2.14 TIERHALTUNGSBEDINGUNGEN	36
2.15 ÜBERSICHT ÜBER DIE EXPERIMENTE	37
2.16 ALLGEMEINE TESTDURCHFÜHRUNG	38
2.17 ROTAROD-TEST	40
2.18 OFFENFELDTTEST	42
2.19 SOZIALER INTERAKTIONSTEST	46
2.20 FORCED-SWIM-TEST	49
2.21 LIPOPOLYSACCHARID-EXPOSITION	54
2.22 VERHALTENSANALYSE MITTELS VIDEOTRACKING	57
2.23 STATISTISCHE AUSWERTUNG	57
3. ERGEBNISSE	60
3.1 DETEKTION DER STAT ^{F77A} -MUTATION MITTELS RESTRIKTIONSVERDAU	60
3.2 NACHWEIS DEFIZIENTER KOOPERATIVER DNA-BINDUNG VON STAT1 ^{F77A}	60
3.3 GEWICHTSENTWICKLUNG DER TRANSGENEN VERSUCHSTIERGRUPPEN	63
3.4 UNTERSUCHUNG MOTORISCHER DEFIZITE DER STAT1 ^{F77A} -TIERE	65
3.5 CHARAKTERISIERUNG DER MAUSLINIE STAT1 ^{F77A/F77A} IM OFFENFELDTTEST	69
3.6 MESSUNG DER SOZIALEN INTERAKTION VON STAT1 ^{F77A} -MÄUSEN	84
3.7 DEPRESSIONSÄHNLICHES VERHALTEN DER MAUSLINIE STAT1 ^{F77A/F77A} IM FORCED-SWIM-TEST	88
3.8 ÜBERLEBENSRATE UND VERHALTEN NACH LIPOPOLYSACCHARID-EXPOSITION	99
4. DISKUSSION	116
5. ZUSAMMENFASSUNG	140
6. SUMMARY	141
7. LITERATURVERZEICHNIS	142
VERZEICHNIS AKADEMISCHER LEHRER	162
DANKSAGUNG	163

Abkürzungsverzeichnis

A	Alanin
ANOVA	Varianzanalyse; Engl.: <i>Analysis of variance</i>
BCG	Bacillus Calmette-Guerin
Bp	Basenpaar
BDNF	Engl.: <i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
BMFZ	Biomedizinische Forschungszentrum der Universität Marburg
CD14	Engl.: <i>Cluster of differentiation 14</i>
cm	Zentimeter
COX	Cyclooxygenase
CRH	Engl.: <i>Corticotropin-releasing hormone</i>
d	Tag
Df	Freiheitsgrade; Engl.: <i>Degrees of freedom</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EKT	Elektrokrampftherapie
EPM	Engl.: <i>Elevated plus maze test</i>
F	Phenylalanin
FST	Forced-Swim-Test
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GAS	Engl.: <i>Gamma-activated site</i>
h	Stunde
Ho	homozygot
HPA	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse; Engl.: <i>Hypothalamic pituitary adrenocortical axis</i>
Ht	heterozygot
ICD	Internationale Klassifikation der Krankheiten
ICSS	Intrakranielle Selbststimulation
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IRF	Engl.: <i>Interferon-regulatory factor</i>
ISGF	Engl.: <i>Interferon-stimulated gene factor</i>

ISRE	Engl.: <i>Interferon-stimulated response element</i>
JAK	Engl.: <i>Janus Kinase</i>
KHK	Koronare Herzkrankheit
Kg	Kilogramm
KI	Konfidenzintervall
KO	Knockout
LBP	Lipopolysaccharid-Bindeprotein
LPS	Lipopolysaccharid
M	Mittelwert
mg	Milligramm
MIG	Engl.: <i>Monokine induced by Gamma-Interferon</i>
Min	Minute
mM	Millimolar
ms	Millisekunde
MyD88	Engl.: <i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i>
N	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
n.s.	nicht signifikant
NF- κ B	Engl.: <i>Nuclear factor-κB</i>
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat-Glutamatrezeptor
NO	Stickstoffmonoxid
OFT	Offenfeldtest
OG	Obergrenze
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (Engl.: <i>Phosphate-buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion
Poly-dIdC	Engl.: <i>Poly(deoxyinosinic-deoxycytidylic) acid</i>
RR	Rotarod-Test
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
SH2	Engl.: <i>Src-homology-2-domain</i>
SIT	Sozialer Interaktionstest
SOCS	Engl.: <i>Suppressor of cytokine signalling</i>
SSRI	Selektiver Serotonin-Wiederaufnahmehemmer

STAT	Engl.: <i>Signal transducer and activator of transcription</i>
t	Zeitpunkt
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TLR4	Toll-like-Rezeptor-4
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
TST	Tail-Suspension-Test
UG	Untergrenze
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1 Die Zytokin-Hypothese der Depression

Die Depression zählt mit einer Lebenszeitprävalenz von 16-21% weltweit zu den häufigsten Erkrankungen des Menschen (Kessler et al., 2005). Ungefähr ein Sechstel der deutschen Bevölkerung erkrankt statistisch gesehen mindestens einmal im Leben an einer depressiven Episode. Aktuell sind in der Bundesrepublik Deutschland etwa 3,1 Millionen an einer behandlungsbedürftigen Depression erkrankt (Wittchen et al., 2000). Auch aus ökonomischer Sicht spielt sie mit Gesamtkosten über 80 Milliarden US-Dollar pro Jahr in den USA eine gewichtige Rolle (Licinio und Wong, 2005). Die Symptome einer Depression zeigen sich sehr heterogen und beinhalten körperliche, psychische und verhaltensbezogene Komponenten (Cryan et al., 2002). In der internationalen Krankheitsklassifizierung (ICD-10) sind die typischen Hauptsymptome einer Depression als depressive, gedrückte Stimmung, Interessenverlust und Freudlosigkeit sowie einer Verminderung des Antriebs mit starker Ermüdbarkeit und Aktivitätseinschränkung definiert. Zusätzliche nach ICD klassifizierbare Symptome sind das somatische und das psychomotorische Syndrom.

Die Pathogenese der Depression ist nach heutigem Stand der Forschung weitgehend unverstanden. In der Literatur existieren unterschiedliche Erklärungsansätze (Krishnan und Nestler, 2008). Hierzu zählen die Monoamin-Defizit-Hypothese mit der Annahme unzureichender Neurotransmitter-Konzentrationen in der Synapse, die Neurogenese-Hypothese als dysfunktionale Bildung neuronaler Strukturen, Veränderungen im endokrinen System, wie z.B. der HPA-Achse, die Hypothese einer Zytokin-induzierten Depression und die verschiedene Einflüsse von epigenetischen Mechanismen. Zusätzlich sind zahlreiche Risikofaktoren für die Entwicklung einer Depression identifiziert worden. Akuter und chronischer Stress, Störungen im endokrinen System, Therapie mit bestimmten Pharmaka, wie Interferonen oder Retinoiden, somatische Komorbidität sowie eine genetische Vulnerabilität erhöhen die Wahrscheinlichkeit an einer depressiven Symptomatik zu erkranken (Krishnan und Nestler, 2008; Tanti und Belzung, 2010). Das Fehlen einer klaren Pathogenese und die Multidimensionalität der Erkrankung lassen eine mehrfaktorielle Genese vermuten und stellen gleichzeitig die weitgehend einheitliche Klassifizierung des Syndroms in Frage (Loftis et al., 2010).

Die gegenwärtige medikamentöse Therapie der Depression beruht auf einer Beeinflussung des zerebralen Monoamin-Systems und bewirkt bei etwa der Hälfte der behandelten Patienten eine Verbesserung der Krankheitssymptome (Trivedi et al., 2006). Eine Remission tritt nur bei einem Drittel der Patienten ein (Rush et al., 2006). Allein diese Zahlen belegen, dass der Bedarf an zusätzlichen Erkenntnissen zur Entstehung und zu den therapeutischen Behandlungsmöglichkeiten groß ist. Die zahlreichen depressionsassoziierten Erkrankungen verkomplizieren nicht nur den Verlauf, sondern sind auch hauptursächlich für eine erhöhte Mortalitätsrate erkrankter Patienten verantwortlich (Moussavi et al., 2007). Die gesteigerte Assoziation der Depression mit infektiösen- aber auch nicht-infektionsbedingten Erkrankungen, die mit einer Aktivierung des Immunsystems einhergehen, wie der koronaren Herzerkrankung, Krebserkrankungen, Asthma bronchiale, Allergien, Diabetes mellitus, multipler Sklerose und Autoimmunerkrankungen, gaben erste Hinweise auf eine pathogenetische Beteiligung des Immunsystems. Komorbid erkrankte Patienten weisen außerdem eine schlechtere Gesamtprognose auf (Evans et al., 2005; Huffman et al., 2006; Knol et al., 2006; Ridker, 2007; Gildengers et al., 2008; Miller, 2009; Benton et al., 2010). In einigen Fällen geht eine Aktivierung des Immunsystems einer deutlich später ausbrechenden depressiven Erkrankung voraus (Foley et al., 1992).

In der Forschung liegen seit mehr als 30 Jahren Publikationen über Veränderungen im Immunsystem depressiver Patienten vor (Irwin et al., 2007). Trotz einiger Unklarheiten herrscht mittlerweile Einigkeit in der Annahme, dass zumindest bei einem Teil der Patienten eine gesteigerte Immunantwort zur Auslösung einer Depression beitragen kann (Miller et al., 2009; dellaGioia und Hannestad, 2010).

Die in den letzten beiden Jahrzehnten entwickelte Zytokin-Hypothese der Depression geht von der Annahme aus, dass das Immunsystem, vermittelt durch die Aktion einiger seiner Mediatoren wie z.B. der Zytokine, depressive Verhaltensmuster auslöst (Dunn et al., 2005). Die heterogene Familie der Zytokine beinhaltet vom Körper produzierte Proteine, die als Wachstumsfaktoren, Mediatoren und Regulatoren der Immunantwort im gesamten Organismus inklusive des Nervensystems wirken. Das Konzept der Zytokin-induzierten Depression gründet sich vor allem auf die quasi-experimentellen Ergebnisse der immunstimulierenden Therapie mit Interferonen oder Interleukin-2. Die Behandlung von chronisch viralen Krankheiten, wie Hepatitis B und C, sowie zahlreichen malignen Erkrankungen löst bei bis zu 70% der Patienten depressionsartige Nebenwirkungen aus (Maes et al., 2001; Bonaccorso et al., 2002; Amodio et al., 2005; Asnis et al., 2006;

Raison et al., 2009). In einer frühen Phase der Therapie sind häufige Nebenwirkungen dieser Medikamente grippeähnliche Symptome wie Abgeschlagenheit, Fieber sowie Kopf- und Gliederschmerzen. Zusätzlich berichten die Autoren über zeitlich verzögert einsetzende neuropsychiatrische Symptome. Diese reichen von leichten Verstimmungen und Denkstörungen bis zu schweren Depressionen oder auch Angsterkrankungen (Musselman et al., 2001; Capuron et al., 2002a; Schaefer et al., 2002; Loftis und Hauser, 2004). Im Gegensatz zu den meist frühzeitig remittierenden zeitnah einsetzenden Nebenwirkungen zwingen die neuropsychiatrischen Symptome die behandelnden Ärzte häufig zu einer Dosisreduktion oder einem Absetzen der Medikation. Da die Zytokin-induzierten depressionsartigen Nebenwirkungen große Übereinstimmungen mit den Symptomen der Depression aufweisen (Loftis und Hauser, 2004) wird gegenwärtig diskutiert, ob es sich um gleichzusetzende Syndrome handelt (Capuron et al., 2009). Im Vergleich mit Patienten der klassischen Depression weisen Interferon- α behandelte Patienten zwar häufiger Gewichtsverlust und psychomotorische Retardierung auf, allerdings sprechen beide Entitäten auf häufig eingesetzte Antidepressiva an (Musselman et al., 2001). Weitere Analoga der Interferon-Nebenwirkungen zur Depression sind die induzierten Veränderungen im Neurotransmittersystem (Capuron et al., 2002b), der HPA-Achse (Capuron et al., 2003a) und des Indolamin-Dioxygenase-Spiegels (IDO) (Capuron et al., 2001) durch die therapeutische Immunstimulation.

Da Zytokinaktionen sowohl die neuronale Mikroglia-Aktivität, zerebrale Stammzellen als auch den „brain derived neurotrophic factor“ (BDNF) beeinflussen, ist die Zytokin-Hypothese wohlmöglich auch in die Neurogenese-Hypothese integrierbar (Miller et al., 2010). Letztere konnte aus der Beobachtung entwickelt werden, dass strukturelle und volumetrische Veränderungen in den depressionsassoziierten Regionen des Hippocampus, der Amygdala, des präfrontalen Cortex und der Basalganglien (Campbell und MacQueen, 2006), eine reduzierte Neurogenese (Sapolsky, 2004) und ein Mangel an BDNF (Angelucci et al., 2005; Monteggia et al., 2007) eng mit der Depression verknüpft sind.

Zum Nachweis einer Beteiligung des Immunsystems in der Pathogenese wurden in einer Reihe von Studien Inflammationsmarker bei depressiven Patienten ohne weitere Komorbiditäten gemessen. Durch erhöhte Spiegel von entzündungsanzeigenden Komponenten des Immunsystems, wie die Akute-Phase-Proteine, proinflammatorische Zytokine, Chemokine, Prostaglandine und Adhäsionsmoleküle, im Blut und Liquor konnte größtenteils die Hypothese bestätigt werden (Zorilla et al., 2001; Howren et al., 2009;

Dowlati et al., 2010). Bei den erhöhten Zytokinspiegeln handelte es sich hauptsächlich um die Interleukine-1 (IL-1), IL-2, IL-6, IL-8 und IL-12 sowie den Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) und die Familie der Interferone (Maes et al., 1999; Konsman et al., 2002; Pollak und Yirmiya, 2002; Hayley et al., 2005; Schiepers et al., 2005; Dantzer et al., 2008; Maes et al., 2009). Darüberhinaus konnte sogar eine Korrelation zwischen dem klinischen Schweregrad der Depression und der Höhe der Inflammationskomponenten in einigen Studien belegt werden (Raison et al., 2009). Auch für die gegenwärtig eingesetzten Antidepressiva ist eine antiinflammatorische Wirkung nachgewiesen worden, da diese Medikamente neben einer Erhöhung der Monoamin-Konzentration in der Synapse auch eine Senkung einiger Entzündungsmarker bewirken (Hiles et al., 2012). Da andere wirksame antidepressive Therapieoptionen wie die Elektrokrampftherapie (EKT) oder die Psychotherapie diese Spiegel ebenfalls effektiv senken, könnte dies einen weiteren antidepressiven Wirkmechanismus darstellen (Maes et al., 1999a; Raison et al., 2006; Miller et al., 2009). Eine Immunaktivierung geht möglicherweise auch mit einer verringerten Ansprechbarkeit auf traditionelle Antidepressiva einher (Raison et al., 2006), sodass diese pathophysiologischen Einsichten bereits neue Therapieansätze in diesem Bereich eröffneten. So konnte bei einem Teil der depressionserkrankten Patienten gezeigt werden, dass die Therapie mit Medikamenten zur Bekämpfung von Entzündungsreaktionen die Depressionssymptomatik verbessert. Hier zeigten COX-Hemmer (Mendlewicz et al., 2006; Müller et al., 2006) und der TNF- α -Antikörper Etanercept (Tyring et al., 2006) potente antidepressive Eigenschaften.

Weitere Unterstützung findet die Zytokin-Hypothese durch das nach einer Aktivierung des Immunsystems beobachtete Sickness-Behavior bei Mensch und Tier. Der Begriff Sickness-Behavior fasst eine Reihe von Verhaltensveränderungen zusammen, die ein Tier erfährt, wenn es mit Pathogenen in Berührung kommt. Hierunter fallen körperliche Symptome wie Aktivitätsverlust, Schwäche, Somnolenz sowie Anorexie und Adipsie. Darüber hinaus bestehen auch kognitive Einschränkungen wie Indifferenz und Freudlosigkeit, Konzentrationsschwierigkeiten und der Interessensverlust an sozialen Kontakten und an der Umgebung. Ein sexueller Aktivitätsrückgang ist ebenfalls Bestandteil des Symptomkomplexes (Dantzer, 2001; Konsman et al., 2002; Pecchi et al., 2009; Miller, 2010). Die Erstbeschreiber bezeichneten diese Verhaltensänderungen keinesfalls als maladaptiv, sondern interpretierten sie als komplexe adaptive Änderung des Motivationsstatus eines kranken Tieres, welche sich positiv auf das Bekämpfen der Infektion und das Überleben auswirkt (Hart, 1988). So zeigten Studien, dass beispielsweise redu-

ziertes Fressverhalten und die Ausbildung von Fieber eine erhöhte Überlebensrate bei erkrankten Versuchstieren bewirken (Aubert, 1999).

Der Symptomkomplex des Sickness-Behaviors zeigt erstaunlich große Übereinstimmungen mit den Symptomen der humanen Depression, wie Anhedonie, Anorexie, Schlafstörungen, reduzierte lokomotorische Aktivität und verringerter Antrieb (Maes et al., 1993a; Yirmiya, 1996). Zudem konnte nachgewiesen werden, dass ähnliche Bereiche des Gehirns von Veränderungen in der Konzentration der Neurotransmitter Serotonin, Dopamin und Noradrenalin betroffen sind. Die wichtigen Bereiche hierbei sind die limbische Region mit Amygdala, Hippocampus und Nucleus accumbens sowie die psychomotorische Region der Basalganglien. Zahlreiche Hirnstammregionen und bestimmte Hirnnervenkerne (u.a. Nucleus tractus solitarius) sind ebenfalls einbezogen (Jüngling et al., 2000; Dantzer, 2001; Pecchi et al., 2009).

Zu den klassischen Sickness-Behavior auslösenden Zytokinen zählen die Interleukine IL-1 und IL-6 sowie der Tumor-Nekrose-Faktor- α . Allerdings sind auch exogene Stimulanzen, wie Lipopolysaccharid (LPS), Bacillus Calmette-Guerin (BCG) oder auch attenuierte Typhus-Vakzine, in der Lage, diese Verhaltensänderungen auszulösen (Dantzer et al., 2008; dellaGioia und Hannestad, 2010). In einigen Publikationen konnte depressionsassoziiertes Verhalten von Interferonen nachgewiesen werden (Makino et al., 1998; Dunn et al., 2005; Loftis et al., 2010).

Auch im Menschen lässt sich eine Induktion von depressiver Stimmung durch Immunstimulanzen nachweisen. Natürlicherweise auftretende Infektionen können depressionsähnliche Symptome hervorrufen (Bucks et al., 2008). In experimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass Influenza- oder Rhinoviren einen Anstieg von Zytokinen hervorrufen, der unabhängig von objektiven Krankheitsparametern eine reduzierte Grundstimmung verursacht. Auch Reichenberg und Kollegen zeigten, dass niedrigdosiertes Lipopolysaccharid (LPS) im Menschen eine reduzierte Stimmungslage induziert ohne dabei physische Krankheitssymptome hervorzurufen. Die depressive Stimmung konnte gut mit laborchemischen Änderungen, insbesondere der Zytokine IL-6 und TNF- α , korreliert werden (Reichenberg et al., 2001). Ebenso ruft bei Gesunden die Gabe von Typhus-Vakzine gedrückte Stimmung, mentale Desorientierung und psychomotorische Verlangsamung hervor (Brydon et al., 2008).

Es bestehen unterschiedliche Annahmen, auf welchem Weg das Immunsystem verhaltensbezogene Veränderungen im Gehirn hervorruft. Aufgrund der molekularen Größe

von Zytokinen, die mit einer Unfähigkeit zur Passage der Blut-Hirn-Schranke einhergeht, existieren alternative das ZNS beeinflussende Routen. Die zirkumventrikulären Organe bilden Regionen aus, in denen die Blut-Hirn-Schranke möglicherweise partiell für Zytokine passierbar ist. Außerdem können die Botenstoffe an spezielle Rezeptoren auf dem Endothel der Hirnkapillaren binden. Diese produzieren in der Folge autonom Zytokine oder alternative Mediatoren. Darüber hinaus sind aktive Transportmechanismen für Zytokine über die Blut-Hirn-Schranke beschrieben. Ein letzter Weg ist die Aktivierung von afferenten Fasern des Nervus vagus, welcher über seine Hirnstammkerne weitere Kerne und Hirnregionen beeinflussen kann (Schiepers et al., 2005). Es scheint im Gehirn ein komplexes System von Zytokin-Rezeptoren, Zytokin-produzierenden Zellen und neuronalen Verschaltungen zu bestehen, welches eine lokal begrenzte Inflammation des Gehirns bewirkt und für die Pathophysiologie der Depression relevant sein könnte (Dantzer et al., 2009; Pecchi et al., 2009; dellaGioia und Hannestad, 2010).

Neben direkten Zytokinwirkungen auf das ZNS werden weitere Mechanismen diskutiert. Der Metabolismus wichtiger Neurotransmitter, wie Serotonin, Dopamin und Noradrenalin, kann durch Zytokine relevant modifiziert werden (Dunn et al., 2005; Miller et al., 2009). So führt eine Überaktivität neuronaler Immunmediatoren zu einem Absinken der Transmitterspiegel und zur Zerstörung neuronaler Zellverbände (Hayley et al., 2005). In diesem Zusammenhang spielt vermutlich der Zytokineinfluss auf das ubiquitäre Enzym Indolamin-2,3-dioxygenase (IDO) eine wichtige Rolle. Unterschiedliche Signaltransduktionskaskaden, wie z.B. auch der STAT1-Weg, sind in der Lage, das Expressionsmuster und folglich die enzymatische Aktivität der IDO zu steigern (Babcock und Carlin, 2000). Dementsprechend kommt es zu einem verstärkten Abbau der Serotonin-Präkursors Tryptophan zu den Metaboliten Kynurenin und Quinolinsäure und somit zu einem Mangel an Serotonin-Neubildung als auch zu gesteigerten neurotoxischen Effekten der beiden Tryptophanmetaboliten (Maes et al., 2007). Durch eine Bindung an NMDA-Glutamat-Rezeptoren, die Produktion von schädigenden Oxidantien und eine Exazerbation der neurotoxischen Effekte von Zytokinen und Cortisol tragen Kynurenin und Quinolinsäure zur Entwicklung einer Depression bei (Müller und Schwarz, 2007; Maes et al., 2009). Zusätzlich hat Quinolinsäure durch eine Erhöhung des IFN- γ /IL-10-Verhältnisses eine proinflammatorische Wirkung (Maes et al., 2007), sodass von IDO-bedingten und über ein singuläres Serotonindefizit hinausgehenden Effektormechanismen ausgegangen wurde (Wichers et al., 2005). Eine Beteiligung der IDO konnte experimentell bei IFN- α , LPS- und Bacillus Calmette-Guerin (BCG)-

induzierter Depression als auch bei klinisch depressiven Patienten beschrieben werden (Capuron et al., 2003b; Neumeister, 2003; Wichers und Maes, 2004; O'Connor et al., 2009; Miller et al., 2009).

Als Folge einer Zytokin-Aktivierung sind zusätzlich auch Beeinflussungen der HPA-Achse durch CRH-Hypersekretion bekannt. Klinisch führt eine Überaktivität der HPA-Achse (z.B. Hypercortisolismus und exogene Kortisol-Therapie) häufig zu depressiven Symptomen. Erhöhte Kortisol- und CRH-Spiegel sowie ein abnormer Dexamethason- und CRH-Test konnten bei 50-70% der Depressionserkrankten gemessen werden (Dunn et al., 2005; Raison et al., 2006; Raison et al., 2008).

Als wichtiger Risikofaktor einer Depression bildet chronischer Stress möglicherweise eine entscheidende Verbindung zwischen einer chronischen Entzündung und der Entwicklung einer Depressivität (Raison et al., 2006; Miller et al., 2009). Da bei Patienten mit einer chronischen Erkrankung die pathophysiologischen Zusammenhänge bereits näher beschrieben wurden (Evans et al., 2005), stellt sich die Frage, ob es auch für somatisch gesunde Depressionserkrankte Hinweise auf das Vorhandensein einer Inflamationsreaktion gibt. Hierbei könnte die Entwicklung von Stress eine Aktivierung des Immunsystems bedingen und in langfristiger Folge eine Depressionserkrankung hervorrufen. Sowohl akuter und chronischer Stress gelten als wichtige Risikofaktoren für die Entstehung eines depressiven Leidens (Kendler et al., 2000). Ein kausaler Zusammenhang erscheint deshalb höchstwahrscheinlich, wenn man bedenkt, dass psychischer Stress die Produktion und Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen (IFN- γ oder TNF- α) aktiviert und gleichzeitig antiinflammatorische Komponenten zentral und peripher inhibiert (Maes et al., 1998; Anisman et al., 2008). Als Folge übermäßiger mentaler Stressoren konnten gehäuft erhöhte Spiegel von Entzündungsmarkern, wie NF- κ B (Bierhaus et al., 2003) und IL-6, gemessen werden. Auch der Stresseinfluss auf Komponenten der HPA-Achse unterstützt eine solche Interpretation (Raison und Miller, 2003).

Zusammenfassend haben die Erkenntnisse im Bereich des Immunsystems zu einem Umdenken im Verständnis der Pathophysiologie der Depression und zur Suche nach neuen Angriffspunkten für antidepressive Medikamente geführt (Cryan et al., 2002; Leonard, 2010; Miller, 2010; Blume et al., 2011). Die Signalwege der Zytokine stellen hierfür potentiell bedeutsame Angriffsziele dar. Da der JAK/STAT-Signalweg die bio-

logischen Funktionen von zahlreichen Zytokinen vermittelt, wurde er in dieser Arbeit genauer untersucht.

1.2 Einführung in die Interferon- γ -Signaltransduktion

Als Mediatoren und Effektorproteine des Immunsystems spielen diverse Zytokine, und unter ihnen besonders Interferone, eine bedeutende Rolle. Grundsätzlich lassen sich Typ-I-Interferone (Interferon- α und - β) von Typ-II-Interferon (Interferon- γ) unterscheiden. Bakterielle oder virale Stimulation löst eine Freisetzung von Interferonen durch Abwehrzellen, wie Makrophagen, T-Lymphozyten und natürliche Killerzellen, aus. Die biologischen Funktionen umfassen antimikrobielle Immunantworten, Antigenprozessierung, Wachstumssuppression, Einleitung von Apoptose und Tumorbekämpfung (Saha et al., 2010). Fast alle biologischen Wirkungen dieser extrazellulären Zytokine werden über einen evolutionär hochgradig konservierten Signaltransduktionsweg vermittelt. Dieser sogenannte JAK/STAT-Signalweg besitzt als zentrale Komponenten einerseits die Janus-Kinasen (JAK) und andererseits Signalproteine aus der STAT-Familie (signal transducer and activator of transcription). Diese wichtige Signaltransduktionskaskade vermittelt die biologischen Wirkungen von zahlreichen Zytokinen (z.B. Interferone, Interleukine, einige Wachstumsfaktoren) auf zellulärer Ebene (Levy und Darnell, 2002). Die Familie der humanen STAT-Proteine besteht aus sieben verschiedenen Proteinen (STAT1 bis STAT6 mit STAT5a und -5b). Alle Komponenten üben eine duale Funktion als Signaltransduktoren und Transkriptionsfaktoren aus und bestehen aus sechs funktionellen Domänen (Darnell, 1997). Der modulare Aufbau eines STAT1-Moleküls ist in Abbildung 1 detaillierter beschrieben.



Abb. 1: Modularer Domänenaufbau des STAT1-Proteins. Die aminoterminal Domäne (ND) ist für die Oligomerisierung, Dephosphorylierung und Aktivierung von DNA-Bindeproteinen verantwortlich (Vinkemeier, 1996; Meyer et al., 2004). Die untersuchte STAT1-Mutante (F77A) liegt ebenfalls in diesem Molekülabschnitt. Benachbart sind die Coiled-Coil-Domäne (CCD) und die DNA-Bindedomäne (DBD). Eine essentielle Funktion in der Formation von STAT1-Dimeren nimmt die SH2-Domäne ein (SH2D). In diesem Bereich findet sich auch der für die Aktivierung benötigte phosphorylierte Tyrosin-Rest (Y701).

Durch Bindung extrazellulärer Zytokine (z.B. Interferone) an membranständige Rezeptoren wird ein Signaltransduktionsweg eingeleitet, der zu einer transkriptionellen Antwort führt. Durch die Ligandenbindung erfolgt zunächst eine Dimerisierung des Rezeptors, was eine JAK-katalysierte Auto-Phosphorylierung und den Einbau von Phosphatresten in das carboxyterminale Ende der Rezeptormoleküle einleitet (Schindler, 1992; Darnell et al., 1994). Letztere bieten nunmehr der SH2-Domäne des STAT-Moleküls eine Dockingstelle und diese Bindung veranlasst die JAKs den Tyrosinrest in Position 701 am carboxyterminalen Ende des STAT1-Proteins zu phosphorylieren (Decker et al., 1997). Im Falle einer Aktivierung durch Typ-I-Interferone bildet sich ein Komplex aus STAT1, STAT2 und IRF9, der als ISGF3 (Interferon-stimulated gene factor 3) bezeichnet wird. Nach der nuklearen Translokation durch Kernporen vermittelt der Komplex an einer als ISRE (interferon-stimulated responsive element) bezeichneten Promotorstelle seine transkriptionelle Aktivität, die der Rekrutierung der DNA-abhängigen RNA-Polymerase bedarf. Analog hierzu kommt es nach Interferon- γ -Rezeptorbindung zur Assoziation von STAT1-STAT1-Homodimeren (Shuai et al., 1994; Greenlund et al., 1995), die ebenfalls über Kernporen in den Zellkern gelangen. Dort binden sie an spezifische, palindrome DNA-Sequenzen in den Enhancer- und Promotor-Regionen der STAT1-Zielgene (Horvath et al., 1995; Darnell, 1997; Meyer et al., 2004; Meyer und Vinkemeier, 2007). Diese STAT1-bindenden Bereiche werden im Fall einer Interferon- γ -Aktivierung als GAS-Stellen (gamma-activated sites) bezeichnet. Über Kontakte ihrer aminoterminalen Domänen können die STAT1-Dimere höhergradige Ketten im Sinne von Tetra- oder auch Oligomeren an der DNA bilden (Vinkemeier et al., 1996; Xu et al., 1996; John et al., 1999). Diese kooperative DNA-Bindung

ist für eine komplette transkriptionelle Aktivität aller IFN- γ -induzierbaren STAT1-Zielgene erforderlich (Meyer et al., 2004). Durch eine Dissoziation der Dimere von der DNA und eine Konformationsänderung erfolgt die anschließende Dephosphorylierung durch nukleare Phosphatasen (Meyer et al., 2003; Mertens et al., 2006). Nunmehr dephosphoryliertes STAT1 gelangt durch Kernexport (Haspel und Darnell, 1999) wieder ins Zytoplasma zurück und steht für eine erneute Aktivierung zur Verfügung (Abbildung 2).

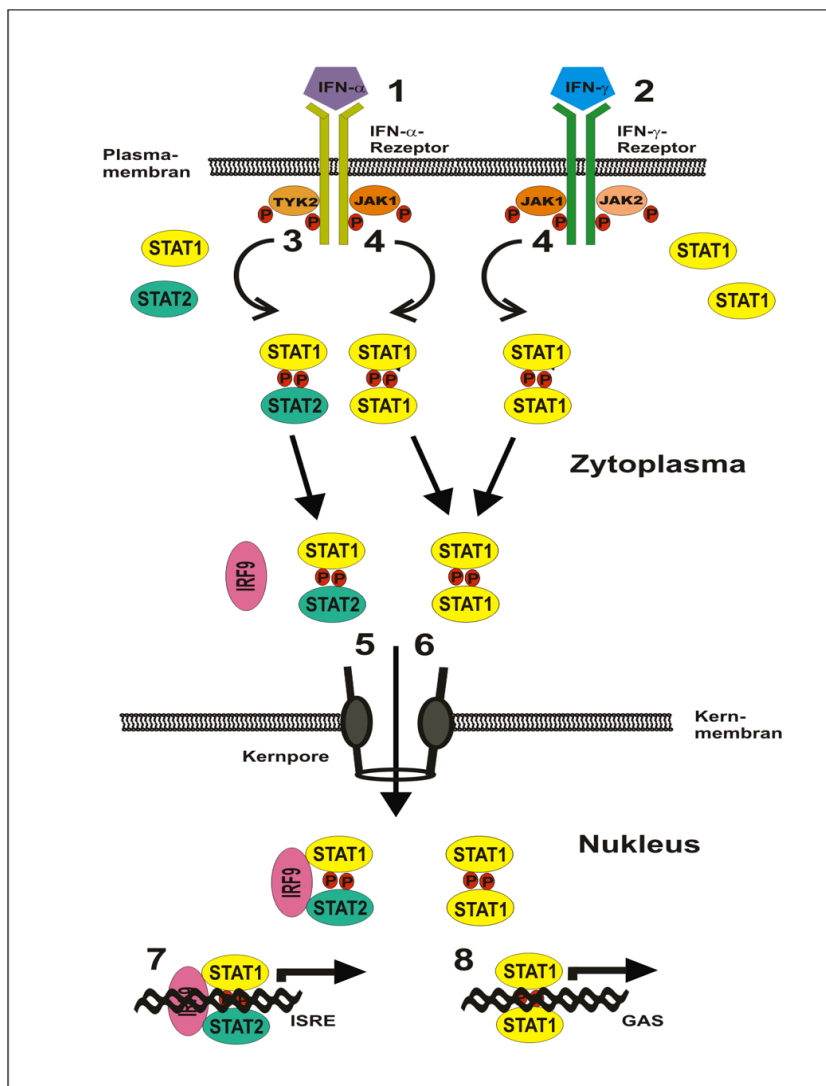


Abb. 2: Aktivierung von STAT1-Zielgenen durch Interferon-Stimulation. Interferon- α - (1) oder Interferon- γ -Ligandenbindung (2) an zytoplasmaständige Rezeptoren initiiert eine JAK-katalysierte Phosphorylierungskaskade, die zur Tyrosin-Phosphorylierung von STAT-Transkriptionsfaktoren führt. Nach Interferon- α - und - γ -Stimulation kommt es zur Bildung von STAT1-Homodimeren und im Falle des IFN- α zusätzlich zu STAT1/STAT2 Heterodimeren (3). Nach Assoziation mit IRF9 tritt der gebildete STAT1/STAT2-Komplex (5) ebenso wie die STAT1-Homodimere durch Kernporen in den Nukleus (6) und bindet an ISRE- (7) bzw. GAS-Stellen (8) in den Promotoren entsprechender Gene.

Nach Interferon-Stimulation der Zelle gelangt STAT1 als phosphoryliertes Dimer mit Hilfe von Importfaktoren in den Zellkern und initiiert dort promotorabhängig eine Aktivierung von Zielgenen. Überdies wurde auch ein ständiges Shuttling von unphosphoryliertem STAT1 zwischen Nukleus und Zytoplasma beschrieben (Chatterjee-Kishore et al., 2000; Meyer et al., 2002). Unphosphorylierte STAT1-Varianten, wie beispielsweise die Punktmutante Y701F, sind zur Apoptose-Exekution durch Expression von Caspase-Genen auch unabhängig von Zytokin-Aktivierung befähigt (Chatterjee-Kishore et al., 2000; Vinkemeier, 2004; Meyer und Vinkemeier, 2007; Yang und Stark, 2008).

Versuchstiere ohne funktionellen STAT1-Signalweg waren zwar voll lebensfähig, zeigten allerdings eine erhöhte Anfälligkeit für bakterielle und virale Infektionen (Durbin et al., 1996; Meraz et al., 1996; Ihle, 2001; Levy und Darnell, 2002; Sugawara et al., 2004). Die Literatur weist in einigen Fallberichten Patienten mit Mutationen im STAT1-Protein auf (Dupuis et al., 2003; Chapgier et al., 2006; Liu et al., 2011; Smeekens et al., 2011; Vairo et al., 2011; van de Veerdonk et al., 2011). Diese litten unter viralen bzw. bakteriellen Infektionen (BCG) oder Pilzinfektionen. Dabei wurden reduzierte Zytokinantworten (Interferon- α , - γ und TNF- α , Interleukin-12) beobachtet (Dupuis et al., 2003; Chapgier et al., 2006). Durch *in vivo* Analyse von STAT1-defizitären Versuchstieren scheint STAT1 vorrangig in der von Interferon- α und - γ ausgehenden Signaltransduktion eine Rolle zu spielen (Durbin et al., 1996; Meraz et al., 1996; Ihle, 2001; Levy und Darnell, 2002).

Die in dieser Arbeit untersuchte STAT1-Mutante entstand im Rahmen von Forschungsarbeiten an der aminoterminalen Domäne durch die Arbeitsgruppe von Prof. Vinkemeier am Leibniz-Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie in Berlin-Buch. Ein punktueller Aminosäureaustausch (Phenylalanin gegen Alanin in Position 77) in dieser Domäne führt nach Meyer und Kollegen zu erheblichen biologischen Effekten der STAT1-Signaltransduktion (Meyer et al., 2004). Die Substitutionsmutante STAT1^{F77A} eine Unfähigkeit zur Tetra- oder Oligomerisierung an der DNA. Dieser Defekt bewirkt promotorabhängig eine verminderte Proteinexpression an natürlichen GAS-Bindestellen nach Interferon- γ -Stimulation, während an artifiziellen GAS-Bindungsstellen teilweise sogar eine verstärkte Proteinexpression festgestellt wurde (Meyer et al., 2004). Der Dephosphorylierungsdefekt der F77A-Variante erklärt sich daraus, dass die aminoterminal Mutante ein schlechteres Substrat für die inaktivierende Phosphatase TC45 ist und deshalb vermehrt als phosphoryliertes Molekül vorliegt, was auch die längere nukleäre Akkumulation in Interferon-stimulierten Zellen erklärt. Die daraus resultierende

Hyperphosphorylierung könnte die erhöhte Aktivität der Transkription an artifiziellen, dreifachen GAS-Bindestellen erklären (Meyer et al., 2004), wobei die biologische Relevanz dieses Befundes unklar bleibt.

1.3 Endotoxin-Wirkung und Verhalten

Die Applikation von Lipopolysaccharid (LPS), einem Bestandteil der Zellmembran von gramnegativen Bakterien, stellt eine häufig angewandte Methode zur Untersuchung und Auslösung von Zytokin-induziertem Sickness-Behavior und depressionsähnlichem Verhalten in tierischen Verhaltenstests dar (Yirmiya, 1996; Dantzer et al. 2008). LPS induziert die Produktion diverser Zytokine, wie IL-1, IL-6, TNF- α , IL-12 und Interferon (Beutler und Rietschel, 2003). Eine ausreichende Menge an LPS kann darüberhinaus ein Sepsis-ähnliches Krankheitsbild auslösen. Periphere Immunzellen, wie Makrophagen, neutrophile Granulozyten, dendritische Zellen und natürliche Killerzellen, exprimieren Toll-like-Rezeptor-4 (TLR4) auf ihrer Zellmembran. LPS bindet unter Mithilfe des Lipopolysaccharid-Bindeproteins (LBP) und des Cluster-of-differentiation-Proteins 14 (CD14) an diesen Rezeptoren. In der Folge werden zwei unterschiedliche Signalkaskaden initiiert. Ein möglicher Weg führt über die Aktivierung von MyD88 zur Induktion proinflammatorischer Zytokine, wie z.B. Interleukin-1. Eine hiervon unabhängige Kaskade stimuliert die Expression von Typ-I-Interferonen. Zwischen beiden Signalwegen bestehen multiple Regulationsmechanismen und Kreuzungspunkte wie beispielsweise die SOCS (Engl.: *Suppressor of cytokine signalling*)-Proteine (Lu et al., 2008).

Die Immunantwort auf eine Stimulation mit LPS ist sowohl von Zytokinen, wie den Interferonen, als auch vom Transkriptionsfaktor STAT1 abhängig. Kamezaki und Mitarbeiter konnten zeigen, dass STAT1-defiziente Mäuse teilweise resistent gegenüber einem LPS-induzierten, septischen Schock sind (Kamezaki et al., 2004), sodass der STAT1-Weg zumindest eine partielle Funktion in der inflammatorischen Reaktion auf dieses Immunstimulanz einnehmen muss. Nach einer Stimulation mit LPS kommt es zu einer Induktion von TNF- α , Interleukin-12 und zahlreichen Chemokinen (Car et al., 1994; Brewington et al., 2001). Wiederholte Applikation von LPS führt zu einem Anstieg von Interferon- γ und TNF- α (Vaknin et al., 2008). Das LPS-stimulierte IFN- γ ist außerdem durch seine Genexpressionsaktivität einer der Hauptinduktoren derIDO via STAT1 (Takikawa et al., 1999). Eine Blockierung dieses Enzyms verursacht eine deutlich reduzierte Ausbildung des Zytokin-induzierten Depressionsverhaltens in Mäusen

(O'Connor et al., 2009b). Aus diesen Gründen verspricht die Untersuchung des JAK-STAT-Weges im organismischen Kontext, neue Einsichten in den Ablauf einer Entzündungsreaktion als auch der Ausbildung depressiven Verhaltens im Tiermodell zu gewinnen.

1.4 Tiermodelle der Depression

Neben dem Endotoxin-induzierten Tiermodell der Depression sind in den vergangenen Jahrzehnten weitere Methoden zur Analyse depressiven Verhaltens entwickelt worden. Diese Modelle zeigten sich in einigen Bereichen der medizinischen Forschung als unverzichtbar, um vertiefte Einblicke in die neurobiologischen und pathophysiologischen Mechanismen im Zusammenhang mit der Pathogenese der Depression zu erlangen. Gleichzeitig können dadurch die Effektivität von antidepressiv-wirkenden Medikamenten oder der Einfluss von Genen sowie Signalwegen experimentell überprüft werden. Speziell für die Depressionsforschung sind Tiermodelle außerordentlich wichtig, da molekularbiologische Untersuchungen am menschlichen Gehirn ethisch nicht realisierbar sind (Vollmayr und Henn, 2007).

Zu den am häufigsten zitierten Kriterien für die Güte eines Tiermodells gehören die von McKinney und Bunney entwickelten Voraussetzungen (Cryan und Mombereau, 2004). Nach diesen sollte eine große Analogie in Manifestation und Symptomatik zwischen der humanen Erkrankung und dem Tiermodell vorliegen (McKinney und Bunney, 1969). Neuere Kriterien stützen sich vorrangig auf die Validität der Testverfahren (Kalueff und Tuohimaa, 2004; MacArthur und Borsini, 2006). Alle drei folgenden Validitätskriterien sollten bei einem guten Modell erfüllt sein (Bai et al., 2001; Clement et al., 2002):

- **Prädiktive Validität:** Wie genau kann das Modell die Effekte von eingesetzten Medikamenten klinisch wiedergeben? Differenziert das Modell zwischen klinisch wirksamen und nicht wirksamen Behandlungen?
- **Augenschein-/Ansichtsvalidität:** Wie groß ist die Analogie zwischen den tierischen und menschlichen Symptomen der Erkrankung?
- **Konstruktvalidität:** Kann die Verhaltensänderung durch eine ähnliche Ursache wie beim Menschen bedingt sein?

Einen pragmatischen Ansatz verfolgten Geyer und Markou, indem sie die prädiktive Validität und eine robuste Reliabilität als einzig notwendige Kriterien für die initiale

Benutzung eines Modells sowohl für die Suche nach wirksamen Antidepressiva als auch für die neurobiologische Grundlagenforschung voraussetzen (Geyer und Markou, 2002; Cryan und Mombereau, 2004).

Da Hinweise auf Selbstreflexion und Bewusstsein bei Tieren fehlen, lassen sich verständlicherweise einige Kardinalsymptome der Depression, wie vermindertes Selbstbewusstsein, unangemessene Schuldgefühle, Negativismus und wiederkehrende Gedanken an Suizid, nicht im Tiermodell nachbilden. Entsprechend waren auch die Versuche, ein einheitliches Tiermodell für das gesamte Krankheitsbild zu generieren, nicht von Erfolg gekrönt. Aus diesem Grund beschränkte man sich auf Modelle für einzelne eindeutige Endophänotypen, die in Kombination die Bestandteile eines psychiatrischen Syndroms bilden und deren Erzeugung methodisch evaluierbar ist (Holmes, 2003; Cryan und Mombereau, 2004). In der Depressionsforschung unterscheidet man psychopathologische und biologische Endophänotypen (Hasler et al., 2004). Die psychopathologischen Endophänotypen umfassen eine geminderte Stimmungslage, Hoffnungslosigkeit, Freudlosigkeit, psychomotorische und angstassoziierte Veränderungen sowie Appetit- und Gewichtsverlust. Zu diesem Konzept gehören außerdem vermindertes Sozialverhalten und eine geänderte Schlafarchitektur. Die biologischen Endophänotypen enthalten neuroanatomische und neuroendokrine Veränderungen sowie Abweichungen im Neurotransmittersystem.

Zur Auslösung und Untersuchung der beschriebenen Endophänotypen existieren verschiedene Modelle, die größtenteils ursprünglich für Ratten entwickelt wurden. Mit dem Aufkommen genetischer Forschung wurde zunehmend der Gebrauch von Mäusen in diesem Bereich bevorzugt. Da psychologischer Stress als Risikofaktor für die Entstehung einer Depression gilt (Raison et al., 2008; Miller et al., 2009) und sich gut im Tiermodell nachstellen lässt, gründen sich eine Vielzahl aktueller Tiermodelle auf der Induktion von akutem oder chronischem Stress. Beliebte Modelle, wie der Forced-Swim-Test (FST) oder Tail-Suspension-Test (TST), provozieren durch akuten Stress einen Zustand der Hoffnungslosigkeit im Versuchstier. Daneben testen belohnungsbaasierte Modelle die Freudlosigkeit (Anhedonie) im Sucrose-Preference-Test (Zuckerlösungstest/SPT) oder in der intrakraniellen Selbststimulation (ICSS). Durch längerfristige adulte Stressmodelle, wie den erlernten Hilflosigkeitstest, den Chronisch-Milder-Stresstest und dem Social-Defeat-Test, lassen sich anhaltende Änderungen im Gewicht, in der Freudlosigkeit, den Schlaf- und sozialen Interaktionsstörungen herstellen. Auch das depressionsassoziierte Symptom der Angst kann im Offenfeldtest, der Hell/-

Dunkelbox, dem Elevated-Plus-Maze-Test (EPM) und dem Novelty-Induced-Hypophagia-Test erkannt werden. Mittlerweile steht den Forschern neben der selektiven Züchtung bestimmter Phänotypen auch die Generierung genetischer Mausmodelle durch Veränderung des Genoms zur Verfügung. Auch die bereits beschriebene Endotoxin (LPS)-stimulierte Aktivierung des Immunsystems ruft messbare und mit Antidepressiva reversible Veränderungen des Organismus hervor (Dunn et al., 2005).

Modelle mit akut induzierter Verhaltensänderung weisen im Vergleich zu chronischen Tests generell eine geringere Konstruktvalidität auf. Ihr großer Vorteil liegt jedoch in einer großen prädiktiven Validität und Reliabilität. Einen Vergleich zwischen den menschlichen Depressionssymptomen und den im Tierversuch modellierten Äquivalenten zeigt Tabelle 1.

DSM Symptome / Endophänotypen	Depressionsassoziiertes Verhalten von Testtieren
Freudlosigkeit	Verringerter Konsum von Zuckerwasser im SPT, ICSS
Signifikanter Gewichts- oder Appetitverlust	Gewichtsverlust oder reduziertes Fressen
Insomnie oder Hypersomnie	Gesteigertes Schlafen
Psychomotorische Agitation oder Retardierung	Verringerte lokomotorische Aktivität und soziale Exploration (OFT, SIT)
Schnelle Ermüdbarkeit oder Antriebsverlust	Verringerte lokomotorische Aktivität (OFT)
Konzentrations- oder Merkfähigkeitsstörungen oder Unentschlossenheit	Verringertes Leistungsvermögen in Lern- und Gedächtnistests (Water-Maze)
Hoffnungslosigkeit (behavioral despair)	Gesteigerte Immobilität im FST

Tabelle 1: Übersicht zwischen Depressionssymptomen und den modellierten Äquivalenten im Tierversuch.

1.5 Ziele der Arbeit

Trotz der klaren Assoziationen zwischen den Effektormechanismen des Immunsystems und der Entwicklung einer depressiven Erkrankung sind die durch Interferone ausgelösten Verhaltensänderungen bislang kaum untersucht. Dies trifft in besonderer Weise für die intrazellulären Wirkmechanismen der Interferone zu, obwohl diese hauptsächlich über einen einzelnen Transkriptionsfaktor, nämlich STAT1, vermittelt werden (Meraz et al., 1996).

Bei therapeutischer Anwendung löst Interferon- α häufig eine klinisch bedeutsame Depression aus (Schaefer et al., 2002). Für Interferon- β und - γ liegen ebenfalls Berichte von psychiatrischen Nebenwirkungen bei behandelten Patienten vor. Allerdings sind die Assoziationen und Auswirkungen in den Publikationen nicht so eindeutig wie bei Interferon- α (Gohier et al., 2003; Loftis und Hauser, 2004). Allerdings konnten bei depressiven Patienten erhöhte Expressionsspiegel von Interferon- γ -mRNA gemessen werden, die sich nach Anwendung von selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmern normalisierten (Tsao et al., 2006). Daneben spricht auch eine starke Interferon- γ -abhängige Mikroglia-Aktivierung für eine potentielle Beteiligung dieses Zytokins (Moran et al., 2007).

Der Versuch, die Symptome im experimentellen Tiermodell nachzuvollziehen, erbrachte keine konstanten depressionsassoziierten Verhaltensänderungen nach Interferon-Gabe (Loftis et al., 2006; Fahey et al., 2007; Loftis et al., 2010). Unterschiede in Applikationsform, Verhaltensanalyse und Testsubjekte könnten zu den kontroversen Resultaten beigetragen haben (Anisman et al., 2007; Loftis et al., 2010), allerdings sind die genauen Gründe hierfür unbekannt.

Eine weitere Option, die Auswirkung von Signalwegen auf Verhaltensebene zu evaluieren, ist die Verhaltensbeobachtung von Knockout- oder transgenen Mauslinien. Einige Gruppen konnten zeigen, dass die Ausschaltung bestimmter Proteine oder Rezeptoren ein antidepressives oder depressives Verhalten erzeugen kann (Pechnick et al., 2004; Chourbaji et al., 2006; Simen et al., 2006; Palin et al., 2008; Basso et al., 2009; Wu et al., 2010).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Erforschung und experimentelle Überprüfung möglicher depressiogener Effekte einer STAT1-Punktmutation. Hierzu wurde der Einfluss einer defizienten kooperativen DNA-Bindung des Transkriptionsfaktors STAT1

auf Verhaltensebene in einer transgenen Knockin-Mauslinie untersucht. Die zu überprüfende Arbeitshypothese lautete dem entsprechend, dass Mäuse mit tetramerisierungsdefizientem STAT1 seltener depressionsähnliche Verhaltensweisen gegenüber Wildtyp-Tieren zeigen.

Ferner sollte durch einen Überlebens- und einen Expositionstest die Rolle von STAT1 in der physiologischen Antwort auf LPS-Stimulation und die Rolle der kooperativen DNA im organischen Kontext genauer untersucht werden. Bei bislang fehlenden experimentellen Daten über die Relevanz der Interferone im Konzept des experimentellen Sickness-Behaviors könnten diese Untersuchungen zu neuen Einsichten über die Bedeutung von STAT1 in der Entstehung einer Depression beitragen.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien zur Genotypisierung

Verwendete Laborkits

peqGOLD Tissue DNA Kit	PeqLab Biotechnologie, Erlangen
Verso cDNA Kit	Thermo Scientific, Schwerte

Benutzte Primer

Die eingesetzten Primer stammten von Invitrogen, Darmstadt.

Name	Sequenz
mSTAT1 F	5'-CGCGAATTGCTAATAAAACAA-'3
mSTAT1 R	5'-TGCTGCTGAGTCCAAATAAAG-'3
mMIG F	5'-AAAATTTTCATCACGCCCTTG-'3
mMIG R	5'-TCTCCAGCTTGGTGAGGTCT-'3
mGAPDH F	5'-AATGGTGAAGGTCGGTGTGAAC-'3
mGAPDH R	5'-GAAGATGGTGATGGGCTTCC-'3

Enzyme

Polymerase Ampli Taq Gold	Applied Bioscience Roche, Mannheim
Polymerase I (Klenow-Fragment)	New England Biolabs, Schwalbach
Proteinkinase K	Qiagen, Hilden
TSP 509I Restriktionsenzym; Quelle: <i>E. coli</i> mit TSP 509I	New England Biolabs

Puffer

Eco-Pol-Puffer von New England Biolabs

NEB-Puffer: 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1mM Dithiothreitol, pH 7,9

TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA-Puffer): 89 mM Tris-HCl, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA, pH 8,2

10x DNA-Auftragspuffer: 50% Glycerol, 0,2% SDS, 0,05% Bromphenolblau, 0,05% Xylencyanol in Tris-Acetat-EDTA-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 2 mM EDTA, pH 8,3) von 5 Prime, Hamburg

Radioaktive Oligonukleotide

α -[^{32}P]-dATP (3000 Ci/mmol)	Perkin Elmer, Rodgau
α -[^{32}P]-dCTP (3000 Ci/mmol)	Perkin Elmer
α -[^{32}P]-dGTP (3000 Ci/mmol)	Perkin Elmer
α -[^{32}P]-dTTP (3000 Ci/mmol)	Perkin Elmer

Sonden

Name	Sequenz
M67 Forward	5'-ACGTCGACATTTCCCGTAAATCTG-3'
M67 Reverse	3'-CAGTCAGATTTACGGGAAATGTCG-5'
2x GAS Forward	5'-AAGTCGTTTCCCCGAAATTGACGGATTTCCCCGAAAC-3'
2x GAS Reverse	3'-CAAAGGGGCTTTAACTGCCTAAAGGGGCTTTGCTGAA-5'

Sonstige Materialien

10x PCR Puffer II	Applied Bioscience Roche, Mannheim
Complete-Mini Protease-Inhibitoren	Roche, Grenzach
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem, Darmstadt
DNA-Molekulargewichtsmarker 100	Roche, Mannheim
Basenpaare	
dNTP mix	Bioline, Luckenwalde
Ethanol	Sigma-Aldrich
Ethidiumbromid	Carl Roth
Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EDTA)	Acros Organics
Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Carl Roth
Ficoll-Paque Plus	Amersham Bioscience, Freiburg

Interferon- γ (murines)	Biomol
IGEPAL-CA-360	Sigma-Aldrich
Kaliumchlorid	Carl Roth
LE Agarose	Biozym Scientific, Hess. Oldendorf
LPS von <i>E. coli</i> 0111: B4	Sigma
MgCl ₂	Applied Bioscience Roche
N-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin- ethansulfonsäure (HEPES)	Carl Roth
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth
Pefabloc	Roche
Rotiphorese Gel	Carl Roth

2.2 Verbrauchsmaterialien

epT.I.P.S Standard original	Eppendorf, Hamburg
Nadeln: Sterican Gr. 20, G 27 x 3/4 / Ø 0,40 x 20 mm,	Braun, Melsungen
Reagiergefäße (micro tubes)	Sarstedt, Nümbrecht
Spritzen: Omnifix 0,01 ml – 1 ml	Braun
Wasser: Water Mol Biograde DNase-, RNase- und Protease-frei	5 Prime, Hamburg

2.3 Verwendete Geräte

Eingesetzte Geräte in den Verhaltensversuchen

Analog-digital Wandler ADVC-50 Computer	Canopus, Ruppach-Goldhausen AMD-Athlon 64 3200+ CPU FSB 1000, 1GB RAM
Kamera: B/W CCD	Vido, Österreich
Lampen: 25 W Glühlampen	Osram, Herbrechtingen
Luxmeter: MS-1500	Voltcraft
Plastikkäfige: PB 1230	Ehret, Emmendingen
Rotarod Programm: TSE Rota-Rod V.2.6	TSE, Bad Homburg

Switch : VD 3004 Video Switch	Vido
Temperaturfühler: GTH 175/Pt Greissinger electronics	Kobe, Marburg
Tierkäfigwechselstation: NU-612	Integra Bioscience, Fernwald
Waage: MXX2001	Kobe
Zange: KN-292B Stainless 2.0,	Nadox

Benutzte Geräte für die Genotypisierung

Agarose Kammer	Biozym scientific
Agarose-Kammer: Horizontal Gel Elektrophoresis System	Cole- Parmer, Vernon Hills, Illinois, USA
Heizblock: UBD2	Grant Instruments, Cambridge, UK
Heizplatte: MR 3001	Heidolph, Kelheim
Mikrowelle	AFK Elektro Vertriebs GmbH, Düsseldorf
PCR Cycler: Gene Amp PCR System 2400	Perkin Elmer, Waltham, USA
PCR Cycler: Gene Amp PCR System 2700	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
Photometer: Gene Quant II	Pharmacia Biotech, Stockholm, Schweden
Pipetten: Eppendorf Research 10-1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Printer: Video Graphic Printer Up-895CE	Sony, Berlin
Schüttler: Labortechnik 3074	Köttermann, Uetze
UV-Gerät	Bio-rad, München
Voltmeter: Standard Power Pack P25	Biometra, Göttingen
Vortexer: Reax 2000	Heidolph, Schwabach
Wärmeschränk: WTC	Binder, Tuttlingen
Zentrifuge: 100 VAC	Carl Roth
Zentrifuge: Biofuge fresco	Thermo Scientific Heraeus, Burladingen

2.4 Fibroblasten-Stimulation

Kardiale Fibroblasten wurden aus explantierten Mäuseherzen von Wildtyp- und STAT1^{F77A/F77A}-Knockin-Mäusen nach Standardtechniken isoliert und durch Transfektion eines für das Large-T-Antigen von SV40 kodierenden Expressionsplasmids immortalisiert. Die Zellen wurden in Fibroblastenmedium supplementiert mit 10% fetalem Kälberserum sowie 1% Streptomycin und 1% Ampicillin kultiviert und durch Trypsinsierung unter Zusatz von EDTA bei konfluentem Wachstum passagiert. Die Stimulation erfolgte durch Vollmedium unter Zusatz von 5 ng/ml Interferon- γ . Sofern nicht anders angegeben, stammten die Materialien des Zellkulturversuchs von Gibco (Karlsruhe) oder PAA Laboratories (Pasching, Österreich).

2.5 Extraktion genomischer DNA

Zur Genotypisierung der Testtiere wurde ein Verfahren aus PCR-Amplifizierung und Restriktionsverdau angewendet. Mithilfe eines kommerziellen Laborkits konnte aus einem Stück Gewebe (Ohrstanze) genomische DNA isoliert werden. Nach der Auflösung des Gewebestücks und der Zellstrukturen wird die DNA in einer speziellen Säule aufgefangen. Die Elution der DNA von dieser Säule lieferte das Material für die weitere PCR-Analyse.

Zur Gewinnung von genomischer DNA erfolgte bei den Testtieren die Entnahme von Ohrstanzmaterial im Alter von 3 Wochen. Dies geschah gleichzeitig mit der Trennung von den Elterntieren und der geschlechtergetrennten Umsetzung in neue Käfige. Die Markierung erfolgte zusätzlich zur sicheren Identifizierbarkeit der Geschwistertiere. Das gewonnene Material wurde in vorbeschrifteten Eppendorf-Reagiergefäßen gesammelt und nach Abschluss der Arbeiten in das kardiologische S1 Labor des BMFZ gebracht. Wenn die DNA-Extraktion nicht unmittelbar folgen konnte, wurden die Proben bei -20°C eingefroren.

Für die Extraktion fand das vorgefertigte Reaktionskit „Gold tissue DNA mini Kit“ der Firma Peq-Lab Verwendung. Zunächst wurde das Stanzmaterial mit dem gelieferten Lysepuffer (200 μ l TL-buffer) sowie 25 μ l Proteinkinase K vermischt und die gesamten Proben bei 55°C in einem Wasserschüttelbad für mindestens 1-3 h oder über Nacht inkubiert. Zur Beschleunigung der Lyse konnten die Proben zwischendurch gevortext

werden. Sobald sich alle festen Bestandteile der Probe gelöst hatten, konnte mit der Weiterverarbeitung fortgefahren werden.

Zunächst mussten Haare und unlösliches Zellmaterial nach Zentrifugieren bei 10000 g über 5 Minuten abpipettiert werden. Das Laden der DNA-Säule wurde durch Zugabe von 200 µl Ladepuffer und Inkubation bei 70°C über 10 Minuten vorbereitet. Voraussetzung hierfür war die Zugabe von 220 µl Ethanol zur Reaktionslösung. Auf das Laden der DNA-Säule folgte eine zweifache Reinigung und Trocknung der DNA. Vorgewärmer 2x 50 µl Elutionspuffer bewirkte die Elution von der Säule. Die extrahierte DNA-Lösung konnte anschließend zur Amplifikation in der PCR eingesetzt werden.

2.6 Polymerasekettenreaktion

Zur Vervielfältigung des relevanten DNA-Abschnitts aus dem STAT1-kodierenden Gen wurde die Polymerasekettenreaktion (PCR) benutzt. Hierbei wurden zwei spezifische Primer mit invers-komplementärer Basenpaarreihung zur Matrize eingesetzt, welche die beiden jeweiligen Enden des Amplifikationsprodukts markierten. Der PCR-Ansatz enthielt in 25 µl Volumen je 25 µM Primer 1 und 2, 25 mM MgCl₂ und 2,5 mM von jedem der vier Nukleotide, hinzu kamen 2,5 µl Zehnfach-Puffer und 0,125 µl Taq-Polymerase. Durch Zugabe von destilliertem Wasser wurden die Proben auf ein Volumen von 25 µl aufgefüllt. Zu jeweils 20 µl des PCR-Standardansatzes wurden 5 µl des DNA-Extraktes hinzugefügt. Während der PCR kam es bei einer Temperatur von 95°C über 30 s zur Trennung der doppelsträngigen DNA in Einzelstränge (Denaturierung). Anschließend ermöglichte durch eine Verminderung der Reaktionstemperatur auf 61°C für 30 s die Anlagerung der Primer an ihre komplementären Basensequenzen (Annealing). Schließlich verknüpfte die hitzestabile Polymerase bei 72°C über 45 s die freien Nukleotide an der komplementären DNA-Matrize (Elongation). Dieser Vorgang wurde in 35 Zyklen wiederholt. Im finalen Schritt folgte eine 7-minütige Elongation. Zur weiteren Verwendung der Proben wurden die PCR-Produkte bei 4°C aufbewahrt. In Tabelle 8 sind die einzelnen Schritte des Programms zusammengefasst.

Temperatur	Zeit	Zyklen	Arbeitsschritt
95°C	10 Min 30 Sek	1	Denaturierung
95°C	30 Sek	35	Denaturierung
61°C	30 Sek		Annealing
72°C	45 Sek		Elongation
72°C	7 Min	1	Elongation
4°C	Dauerhaft bis Entnahme		

Tabelle 8: PCR-Programm für die Genotypisierung. Die Tabelle zeigt die unterschiedlichen Schritte im benutzten PCR-Programm.

2.7 Restriktionsendonukleasenverdau

Nach der Amplifikation des STAT1-Genabschnitts erfolgte die Spaltung der DNA-Stränge durch TSP 509I. Durch den Einsatz dieser Restriktionsendonuklease ließen sich die verschiedenen Genvarianten unterscheiden. Das verwendete Enzym katalysiert die Spaltung von Phosphordiesterbindungen des DNA-Amplifikats an der Erkennungssequenz 5'-AATT-3'. Im Folgenden ist die Nukleotidsequenz des genomischen PCR-Amplifikats mitsamt den TSP 509I-Schnittstellen aufgeführt.

5'-CGCGA**AATT**GCTAATAAAACAAGGTCAGGTTAAACGCAAAGCTAA**AATT**CCCGCTG
TTGTAGGGAGCACGCTGCCTATGATGTCTCGTTTGC GACCATCCGCTTCCATGACCT
CCTCTCACAGCTGGACGACCAGTACAGCCGCTTTTCTCTGGAGAATA**AATT**TCTTGTT
GCAGCACAACATACGGAAAAGCAAGCGTAATCTCCAGGTACGGACTGGCTTTGAG
CCTCACTTGAAGTGTCTCCGCTGACTTAAACCTTTT**CTTTATTTGGACTCAGCAGCA**-
3'

In der abgebildeten Sequenz des PCR-Produktes (es wurde nur einer der beiden invers-komplementären DNA-Stränge aufgeführt) sind die Restriktionsstellen in fetter und die Primersequenzen in kursiver Schrift dargestellt. Durch die Spaltung des Enzyms resultierten DNA-Fragmente mit folgender Länge: 4 bp-, 40 bp-, 114 bp- und 124 bp.

Durch Mutation des für Phenylalanin-kodierenden Triplets nach Alanin in der STAT1^{F77A}-Variante entfiel die dritte Schnittstelle für das Restriktionsenzym; folglich entstand ein ungeschnittenes 238 bp langes Fragment. Für die einzelnen Genotypen ergaben sich für die Wildtyp-Variante STAT1^{WT/WT} Fragmente von 4, 40, 114, und 124 Basenpaaren; die heterozygote Variante wies 4, 40, 114, 124 und 238 Basenpaarstücke auf und Gewebeproben aus homozygoten Tieren zeigten Bruchstücke von 4, 40 und 238 Basenpaaren.

Zum Ansatz eines Restriktionsverdau wurden neu markierte Testtubes mit jeweils 5 µl PCR-Amplifikat gefüllt und danach 10 µl des vorher gefertigten Standardansatzes aus 0,3 µl Enzym, 1,5 µl NEB-Puffer und 8,2 µl gereinigtes H₂O hinzugefügt. Nach der Durchmischung durch Vortexen gelangten die Ansätze in einen Wärmeschrank, wo der Verdau über Nacht bei 45°C oder über 2 h bei 65°C erfolgte.

2.8 Agarose-Gelelektrophorese

Die analytische Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte durch den Einsatz von Agarose-Gelelektrophoresen. In Abhängigkeit der Größe der Fragmentstücke wurde 1 bis 2,5%-ige Nativ-Agarose als Matrix verwendet. Die Trennung der Fragmentstücke gelang durch das Anlegen eines elektrischen Feldes. Durch die negative Ladung der DNA wandern die Stücke mit unterschiedlicher Geschwindigkeit abhängig von ihrer Größe zur Anode. Durch Zugabe von DNA-interkalierendem Ethidiumbromid können die einzelnen DNA-Fragmente unter einem UV-Transluminator sichtbar gemacht werden.

Die Agarose wurde durch Erhitzen in einer Mikrowelle in 0,5-fachem TBE-Puffer aufgelöst. Während des Abkühlens erfolgte die Zugabe von Ethidiumbromid (2 µg auf 100 ml Gellösung) unter ständigem Umrühren. Nach Ausgießen und Erkalten der Agarose in einer Elektrophoresekammer konnten die Proben nach Vermischung mit einem Auftragspuffer in die entstandenen Taschen gefüllt werden. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde außerdem ein DNA-Längenstandard in Form eines 100 Basenpaarmarkers und ein ungeschnittenes PCR-Amplifikat aufgetragen. Das Anlegen eines elektrischen Spannungsfeldes (70 bis 120 Volt) trennte die Fragmente entsprechend ihrer Größe. Die in dem UV-Transluminator sichtbaren DNA-Fragmente konnten zur Analyse und Dokumentation fotografiert werden.

2.9 Photometrische Messung der DNA-Konzentration

In einigen Fällen wurde zur Kontrolle des DNA-Gehalts der PCR- oder Restriktionsverdau-Proben eine Konzentrationsmessung durchgeführt. Durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm mit dem Photometer lässt sich bei einer beliebigen PCR- oder Restriktionsverdau-Probe die Konzentration der DNA bestimmen. Zur Berechnung der Konzentration lässt sich folgende Formel benutzen:

Konzentration $c = 50 \cdot \text{Verdünnungsfaktor } f \cdot \text{Absorption bei } 260 \text{ nm } A_{260}$.

Den Referenzwert für die Kalibrierung des Photometers liefert die Messung einer Leerprobe mit destilliertem Wasser. Üblicherweise wurde eine 1:10-Verdünnung der zu messenden Probe verwendet.

2.10 Proteinextraktion

Kultivierte kardiale Fibroblasten aus STAT1-Wildtyp- oder STAT1^{F77A/F77A}-exprimierenden Mäuseherzen wurden für 45 min mit murinem Interferon- γ stimuliert oder unbehandelt gelassen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die behandelten Zellen einmal mit kaltem PBS gewaschen und für 5 min mit eiskaltem cytosolischen Extraktionspuffer (20 mM Hepes, pH 7,4, 10 mM KCl, 10 % (v/v) Glycerin, 1 mM EDTA, 0,1 mM Na₃VO₄) auf Eis lysiert. Dem Puffer wurden unmittelbar vor der Extraktion 0,1 % IGEPAL-CA-360, 3 mM DTT, 0,4 mM Pefabloc und Complete-Mini-Protease-Inhibitoren zugegeben. Pro Loch einer 6-Loch-Platte wurden 35 μ l Puffer verwendet. Dann wurden die Zellen mit einem Zellschaber gelöst und für 15 sec bei 13000 rpm und 4 °C zur Sedimentierung der Zellkerne zentrifugiert. Die Überstände wurden in ein neues Gefäß überführt und erneut für 5 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die pelletierten Zellkerne wurden mit 35 μ l nukleärem Extraktionspuffer (20 mM Hepes, pH 7,4, 420 mM KCl, 20 % (v/v) Glycerin, 1 mM EDTA, 0,1 mM Na₃VO₄, 3 mM DTT, 0,4 mM Pefabloc und Complete-Mini-Protease-Inhibitoren) resuspendiert. Nach 30-minütiger Lyse auf Eis wurden die nukleären Extrakte für 15 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die Überstände der cytosolischen und nukleären Extraktion wurden vereinigt und portioniert bis zum Gebrauch bei -80 °C gelagert.

2.11 Kompetitions-Gelshift-Assay

Der Nachweis spezifischer DNA-Bindung von STAT1 wurde mittels EMSA (elektrophoretischer Mobilitäts-Shiftassay) geführt. Radioaktiv-markierte Doppelstrang-DNA-Moleküle mit singulärer (M67) und zweifacher GAS-Stelle (2xGAS) wurden zur Detektion von STAT1-DNA-Komplexe eingesetzt. Bei der Sondenherstellung erfolgte zunächst eine Hybridisierungsreaktion der einzelsträngigen Oligonukleotide bei 95°C für 5 Minuten in Oligo-Puffer (10 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5) bei einer Konzentration von 50 pmol/mL je Oligonukleotid, gefolgt von einem langsamen Abkühlen auf Raumtemperatur. Anschließend schloss sich die Auffüllung der Oligo-

nukleotidüberhänge mit radioaktiv markierten Nukleotiden durch das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I (New England Biolabs) an. Im Speziellen wurden dazu 0,1 ng doppelsträngige Oligonukleotide mit jeweils einzelsträngigen Überhängen und je 8 µl der vier [³²P]-markierten Desoxynukleotide (dNTP) mit 5 Einheiten Klenow-Enzym in 5 µl 10x Eco-Pol-Puffer (New England Biolabs) bei Raumtemperatur für 25 Min. in einem Reaktionsvolumen von 50 µl inkubiert. Anschließend wurde 1 µl einer nicht-radioaktiven dNTP-Lösung (6,5 mM je dNTP) zugegeben und für 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 1 µl einer 0,5-molaren EDTA-Lösung wurde die Markierungsreaktion gestoppt und abschließend nicht verwendete freie Nukleotide durch Zentrifugieren über Illustra-MicroSpin-G-25-Säulen (GE Healthcare) für 3 Min. bei 700 g abgetrennt.

Die eigentliche EMSA-Reaktion wurde mit 1 ng der radioaktiv markierten Sonde, 1 µl einer Poly-Desoxyinosid-Desoxycytidin-Lösung (Poly-dIdC, mittlere Länge ca. 800 Bp) der Konzentration 2 mg/ml und 2,5 µl 5x Shift-Puffer (100 mM Hepes, pH 7,9, 20% Ficoll, 5mM MgCl₂, 200 mM KCl, 0,5 mM 1,2-Bis-(2-aminoethoxyethan)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure (EGTA), 2,5 mM EDTA), 13 µL DTT (100 mM) und 4,5 µl Gesamtzellextrakt durchgeführt. Eine Kompetition wurde durch den Zusatz von nicht radioaktiv-markierter DNA erreicht, wofür zum Ansatz unmarkierte Doppelstrang-Oligonukleotide im 750-fachen molaren Überschuss gegeben wurden. Um ein Volumen von 13 µl zu erreichen, wurde die Probe mit PBS oder mit untransfizierten Gesamtzellextrakten aufgefüllt.

Das Polyacrylamidgel konnte nach einer 15-minütigen Inkubation beladen werden. In nativen, prä-äquilierten 4,8%-igen Polyacrylamid-Gel wurden die Proben bei 400 V und 4°C mit 0,25x TBE-Puffer über etwa 2,5 h aufgetrennt. Die Gele bestanden aus einer Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)-Lösung (Rotiphorese Gel 40), 0,2% APS und 0,1% TEMED in 0,25x TBE. Nach Abschluss der Auftrennung wurde das Gel für 2 h auf Whatman-Papier vakuumgetrocknet und mindestens über Nacht bei RT auf Phospho-Imager-Folie exponiert. Die Auswertung der gebundenen Radioaktivität gelang durch die Detektion mit Hilfe des Fujifilm-BAS-1000 (Fuji, Düsseldorf). Die Datenbeurteilung erfolgte mit dem Programm Photoshop von Adobe.

2.12 Reverse-Transkriptase PCR

Exemplarisch wurde die Geninduktion des Interferon- γ -responsiven *mig*-Gens in Fibroblasten aus STAT1^{WT/WT}- und STAT1^{F77A/F77A}-exprimierenden Mäusen mittels Reverse-Transkriptase-PCR untersucht. Dazu wurden die Fibroblasten aus den transgenen Tieren in 6-Loch-Multischalen bis zur Konfluenz kultiviert und in 1% fetalem Kälberserum-enthaltendem Medium über Nacht kultiviert. Anschließend wurden die Zellen entweder unbehandelt belassen oder für 6 h mit 5 ng/ml murinem Interferon- γ stimuliert. Die RNA-Isolation erfolgte nach Entfernen des Mediums mit Hilfe des peqGold Total RNA Kits nach Herstellerangaben. Für die Elution der RNA wurde 50 μ l RNase-freies Wasser verwendet. Komplementäre DNA (cDNA) wurde durch reverse Transkription mit Hilfe des Verso-cDNA-Kits hergestellt. Pro 20 μ l Ansatz wurden 8 μ l RNA eingesetzt. Die quantitative Bestimmung der spezifischen Menge der Transkriptionsprodukte erfolgte mittels PCR unter Verwendung der oben aufgeführten Primerpaare. Als Kontrolle diente die Expression des *gapdh*-Gens der jeweiligen Probe. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und das Agarosegel nach Anfärbung mit Ethidiumbromid im UV-Licht betrachtet.

2.13 Transgene Testmäuse

Die Knockin-Mauslinie STAT1^{F77A} entstammte der Arbeitsgruppe Vinkemeier am Leibniz-Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie in Berlin-Buch. Die Aufzucht einer Kolonie und Rückkreuzung auf C57Bl/6-Hintergrund erfolgte unter pathogenfreien Bedingungen in der SPF (specific pathogene free)-Tierhaltung des Biomedizinischen Forschungszentrums der Universität Marburg (BMFZ). Der Inzuchtstamm C57Bl/6 ist eine häufig genutzte genetische Basis für transgene Mausmodelle, da diese Linie ein aktives und konstantes Verhalten in Verhaltensexperimenten zeigt (Picciotto und Wickman, 1998).

Um die transgenen Tiere in den Verhaltensexperimenten einsetzen zu können, wurde eine über acht Generationen laufende Rückkreuzungszucht aufgebaut (Smithies und Maeda, 1995). Eine Mauslinie weist nach diesem Prozess ein zu 98% identisches Genmaterial untereinander auf (Kustova et al., 1998). Die in unterschiedlichen Zuchtpaaren mit variablen Genotypen geborenen Mäuse exprimierten im STAT1 Protein an Position 77 die F77A Mutation heterozygot (STAT1^{F77A/WT}), homozygot (STAT1^{F77A/F77A}) oder

den Wildtyp ($\text{STAT1}^{\text{WT/WT}}$). Die C57Bl/6-rückgekreuzte $\text{STAT1}^{\text{F77A/F77A}}$ -Mauslinie ist in heterozygoter und homozygoter Ausprägung voll lebensfähig und zeigt keine pathologischen Auffälligkeiten. Ein exemplarisches Mausindividuum dieser Zucht ist in Abbildung 3 dargestellt. Die Tierversuche wurden gemäß des Deutschen Tierschutzgesetzes beantragt und unter der Versuchsnummer Nr. V54-19c 20-15 MR 20/11 durch die Tierschutzkommission des Regierungspräsidiums Gießen genehmigt.

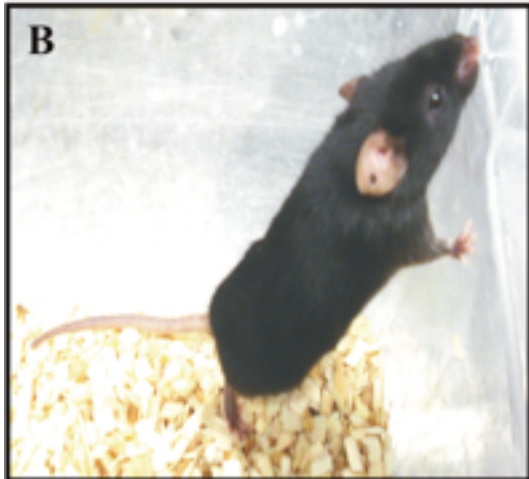


Abb. 3: Die transgene $\text{STAT1}^{\text{F77A/F77A}}$ -Mauslinie ist lebensfähig und zeigt keinen auffälligen Phänotyp. Das Bild zeigt eine homozygote Maus des Genotyps $\text{STAT1}^{\text{F77A/F77A}}$ mit Ohrmarkierung.

Für die Verhaltensexperimente wurden Mäuse ähnlichen Alters (± 1 Woche) in Kohorten unterteilt, die gemeinsam die Testbatterie über drei Monate durchliefen. Bei der Auswahl der Versuchstiere für die einzelnen Testkohorten wurden möglichst Geschwistertiere aus heterozygoten Zuchtpaaren entnommen und entsprechend ihres Genotyps aufgeteilt (Crawley und Paylor, 1997; Picciotto und Wickman, 1998; Gingrich und Hen, 2000). Es war allerdings nicht möglich, die Testtiere ausschließlich aus diesen Zuchtpaaren zu rekrutieren, sodass auch auf Zuchtpaare mit variablem elterlichen Genotyp zurückgegriffen wurde.

Die zusätzlich für den sozialen Interaktionstest benötigten C57Bl/6-Wildtyp-Mäuse wurden altersgleich zu ihren Partnern bei der Firma Harlan, Niederlande, bestellt. Da sich männliche und weibliche Tiere in Verhaltenstests häufig deutlich unterscheiden (Palanza, 2001; Dalla et al., 2010) und der weibliche Ovulationszyklus zusätzliche Verhaltensänderungen bedingt, wurden ausschließlich männliche Mäuse in die Experimente eingeschlossen.

Die folgende Tabelle zeigt den Aufbau der Kohorten der einzelnen Versuche.

Kohorte	STAT1 ^{WT/WT}	STAT1 ^{F77A/WT}	STAT ^{F77A/F77A}
1	8	8	-
2	12	4	8
3	6	3	3
4	10	3	7
5	13	6	7
Gesamt	49	24	25

Tabelle 2: Aufbau der Kohorten für den Baseline-Versuch. Insgesamt wurden 98 Mäuse über jeweils acht Wochen in fünf unterschiedlichen Kohorten getestet.

Im Überlebenstest wurden jeweils 24 STAT1^{WT/WT}- und 24 STAT1^{F77A/F77A}-Tiere miteinander in einer einzelnen Kohorte verglichen. Ebenfalls in einem Testdurchlauf fand der Expositionstest statt. Eine Kohorte bestehend aus 20 STAT1^{WT/WT}-, 20 heterozygoten STAT1^{F77A/WT}- und 19 homozygoten STAT1^{F77A/F77A}-Tieren, die entweder mit LPS behandelt wurden oder als Kontrollen NaCl-Lösung erhielten.

2.14 Tierhaltungsbedingungen

Die Versuchstiere wurden im biomedizinischen Forschungszentrum der Universität Marburg (BMFZ) geboren und gehalten. Die Zucht des transgenen Mausstammes fand im geschlossenen SPF-Teil des Tierstalles und die Verhaltensexperimente im tierexperimentellen Gebäudeabschnitt statt. Die Beleuchtung in der Tierhaltung erfolgt im Hell/Dunkel-Verhältnis von 1:1, wobei die Tagphase sich von 7:00 Uhr morgens bis 18 Uhr abends erstreckte. Die konstante Raumtemperatur in den Zuchträumen und im Verhaltenslabor betrug 22°C, der Luftdruck lag bei ca. 1000 hPa und die relative Luftfeuchtigkeit erreichte ungefähr 50%. Bei den Haltungskäfigen (35x20x14 cm; Firma Ehret) wurden einmal wöchentlich die Streu und die Käfigdeckel gewechselt. Das für die Tiere frei verfügbare Futter (Teklad Global Diet) und Wasser wurde ebenfalls nach Bedarf regelmäßig aufgefüllt und erneuert. Die routinemäßige Versorgung der Versuchstiere wurde durch das tierpflegerische Personal des BMFZ übernommen, das täglich eine klinische Beobachtung durchführte.

Im Alter von mindestens drei Wochen post-partum erfolgte die Entwöhnung der Jungtiere von den Elterntieren und die nach Zuchtpaaren und Geschlechtern getrennte Umsetzung in neue Käfige. Aus tierschutzrechtlichen Gründen wurden die Käfige immer nur mit maximal sechs Tieren besetzt. Im gleichen Arbeitsschritt wurde den Tieren eine Ohrstanzmarke zur Genotypisierung und Markierung mittels einer Stanzzange (KN-292B Stainless 2.0, Nadox) entnommen.

Ungefähr ein bis zwei Wochen vor Testbeginn, d.h. ca. im Alter von 6-7 Wochen, erfolgte die Überführung der Testmäuse in den tierexperimentellen Bauabschnitt. Hier sollten sich die Testtiere an die neue Haltungsumgebung gewöhnen, um etwaige Testverfälschungen durch die neue Umgebung zu minimieren. Die altersgleichen hinzugekauften Wildtyp-Tiere erhielten eine Eingewöhnungszeit an die neue Haltungsumgebung von mindestens 5 Tagen, um mögliche transport- und umgebungsbedingte Testverfälschungen niedrig zu halten. Die Haltung der Versuchstiere des Baseline-Tests erfolgte in Gruppen gleichen Alters, Genotyps und Geschlechts zu höchstens vier und mindestens zwei Tieren. Für den Überlebens- und Expositionstest erfolgte die Gruppenhaltung mit nur jeweils zwei Tieren pro Käfig.

2.15 Übersicht über die Experimente

Um transgene Mauslinien in Verhaltensexperimenten zu charakterisieren, wurden Testbatterien entsprechend den einschlägigen Literaturempfehlungen durchgeführt (Crawley und Paylor, 1997; Takao und Miyakawa, 2006). Die vorliegende Arbeit umfasst aus praktischen, tierschutzrechtlichen und ökonomischen Gründen die Durchführung von fünf Tests. Diese sollten erstens einen möglichen depressionsassoziierten Phänotyp aufdecken und zweitens Defizite ausschließen, die als Störgrößen in Betracht zu ziehen wären.

Die Verhaltensexperimente des Baseline-Tests begannen für die Mäuse im Alter von 8 Wochen und folgten immer der gleichen Reihenfolge. Die Testbatterie bestand zu Anfang aus dem Rotarod-Test, dann folgte ein testfreier Tag. Der Offenfeldtest (OFT) und der soziale Interaktionstest (SIT) folgten an den nächsten beiden Tagen. Nach einem Tag Testpause schloss sich mit dem Forced-Swim-Test (FST) der physisch und psychisch belastende Test an. Diese Testreihenfolge wurde gewählt um für die Tiere einen möglichst stressarmen Testablauf zu gewährleisten. Auch eine Beeinflussung der vorherigen Tests sollte durch diese Reihenfolge möglichst gering gehalten werden (McIllwain

et al., 2001). Der OFT stand an zweiter Stelle der Testabfolge, da sein Ergebnis durch vorangehende belastende Tests stark beeinflussbar ist (Gould et al., 2007).

Tag	1	2	3	4	5	6
Tests	Rotarod-Test	Pause	Gewichtserfassung/ Offenfeldtest	Social- Interaction- Test	Pause	Forced- Swim- Test

Tabelle 5: Testreihenfolge Baseline-Test. Getestet wurden jeweils 26 Wildtyp-, 24 heterozygote- und 25 homozygote Mäuse innerhalb von fünf unterschiedlichen Kohorten. Im gleichen Lebensalter durchliefen die Versuchstiere die dargestellte Testbatterie, die mit dem physisch leichtesten Test begann und mit dem anstrengendsten endete. Aufgrund des gleichen Testaufbaus konnten der Offenfeldtest und der soziale Interaktionstest ohne Pause durchgeführt werden.

Als weiterer Versuch wurde das Überleben, der Gewichtsverlauf und das Verhalten nach intraperitonealer Applikation subletaler Dosen von Lipopolysaccharid (LPS) aus *E. coli* über einen Zeitraum von 10 Tagen getestet. Der Ablauf des Expositionstestes mit LPS bestand aus zwei Komponenten (Gewicht und OFT), welche am gleichen Tag erhoben wurden.

Tag	1	2	3	4	5	6	10
Test	OFT (Baseline)	OFT	OFT	OFT	OFT	OFT	OFT

Tabelle 6: Testabfolge des Expositionstests. Getestet wurden insgesamt 59 Mäuse mit drei unterschiedlichen Genotypen und zwei Behandlungsformen (LPS- versus NaCl-Injektion). An Tag 1 wurde das Verhalten im Offenfeld der unbehandelten Tiere erhoben, unmittelbar anschließend erfolgte die Behandlung und die Untersuchung im Offenfeld-Test zu den angegebenen Tagen.

2.16 Allgemeine Testdurchführung

Die Versuchstiere der Kohorten des Baseline-Test wurden im Alter von 8, 12 und 16 Wochen getestet. Bis auf den Rotarod-Test wurden alle Versuche im Verhaltenslabor der tierexperimentellen Abteilung des BMFZ während der Hellphase des Labors etwa zwischen 8 und 16 Uhr durchgeführt. Das Verhaltenslabor ist ein gut schallisierter

Raum, dessen Zugang für andere Personen während der Versuche nicht möglich war. Um eine gewisse Gewöhnung der Testtiere an den Raum zu ermöglichen, wurden die Tiere zu Testbeginn in ihren Käfigen in das Verhaltenslabor gebracht und auf dem Arbeitstisch abgestellt. Die Tiere bekamen vor Testbeginn eine Akklimatisierungszeit von mindestens 15 Minuten. Alle Tiere waren zu Beginn der Experimente testnaiv, d.h. sie kannten den Versuchsaufbau und Testraum nicht.

Die Vorbereitung der Tests begann mit der Identifizierung der Mäuse und der Platzierung in kleinere Plastikkkäfige. Für das Umsetzen wurden die Mäuse stets vorsichtig und mit kurzem Abstand zum Körper an der Schwanzwurzel gegriffen und so angehoben. Das Wiegen der Tiere erfolgte in jeder Kohorte jeweils vor dem OFT mit einer im Verhaltenslabor befindlichen Waage. Anschließend wurde die Beleuchtungsstärke im Zentrum der Arenen für den OFT und SIT während der Experimente auf ungefähr 3 Lux eingestellt. Dies ließ sich durch ein digitales Lichtstärkemessgerät (Luxmeter, Conrad) verifizieren.

Nach Konfiguration der Programme (RSE Rotarod V2.6, Viewer II, High throughput forced swim test) an den jeweiligen PCs wurden die Mäuse per Hand im Zentrum der Arenen platziert und danach die Tests gestartet. Um Verfälschungen durch die Reihenfolge der Arenen zu vermeiden, erfolgte der Beginn des Einsetzens zufällig. Während aller Versuche blieb der Versuchsleiter im Raum und verhielt sich möglichst ruhig. Nach Ablauf der Zeit wurden die Mäuse wieder vorsichtig den Testarenen entnommen und wieder in ihre Heimkäfige zurückgesetzt. Anschließend kehrten sie wieder in ihre gewohnten Haltungsbedingungen zurück.

Da Nager eine Testarena durch Ausscheidungsprodukte und Duftstoffe markieren und demzufolge das Verhalten nachfolgender Tiere beeinflussen (Galef und Buckley, 1996; Roche und Timberlake, 1998), wurden alle Testapparaturen vor und nach jeder Kohorte mit Alkoholdesinfektionsmittel (Terralin liquid, Schülke) gereinigt. Zwischen den einzelnen Testdurchgängen wurden die Arenen gründlich von Ausscheidungsrückständen befreit und mit einprozentiger Essigsäurelösung geputzt. Diese übt nach Erkenntnissen der Arbeitsgruppe experimentelle Neurologie der Universität Marburg die geringste olfaktorische Beeinflussung auf Nagetiere aus (Dr. Borta, mündliche Mitteilung).

Um die Wahl der Testarena als eine mögliche Störgröße auszuschließen, erfolgte eine zufällige Verteilung der Versuchstiere bei allen Tests und Testzeitpunkten auf die verschiedenen, parallel angeordneten Arenen. Beim OFT, SIT und FST erfolgte ein Video-

aufzeichnung des Verhalten der Testtiere durch eine stationäre Kameraerfassung. Die Analyse erfolgte durch das Softwareprogramm Viewer. Der genutzte Arbeitsplatz ist in Abbildung 4 zu sehen.



Abb. 4: Digitale Online-Erfassung des Maus-Verhaltens am Arbeitsplatz im Verhaltenslabor. Alle Verhaltensversuche mit Ausnahme des Rotarod-Tests wurden im Verhaltenslabor des BMFZ Marburg durchgeführt. Dargestellt ist der für die Auswertung der Verhaltensdaten benutzte Computer und die Software der Firma Biobserve.

2.17 Rotarod-Test

Zu Beginn der Testbatterie des Baseline-Tests stand mit dem Rotarod-Test der einzige außerhalb des Verhaltenslabors durchgeführte Test zur Verfügung. Als einfacher Verhaltensversuch ermöglicht der Rotarod-Test eine Überprüfung der erzwungenen motorischen Leistung, der Koordinationsfähigkeit und des Gleichgewichtssinns. Darüber hinaus können neurotoxische und motorische Nebenwirkungen eines Teststoffes im Tiermodell überprüft werden. Grundsätzlich kann der Rotarod-Test auch zur Überprüfung der motorischen Lernfähigkeit eingesetzt werden (Caston et al., 1995; Lalonde et al., 1995; Shiutsuki et al., 2010). Häufig wird der Rotarod-Test in der Pharmakologie in der frühen Phase einer Medikamentenentwicklung genutzt, um potentielle Nebenwirkungen frühzeitig zu erkennen. Auch genetisch veränderte Tiere können mit diesem Test auf Veränderungen einem Screening unterzogen werden (Minasyan et al., 2009).

Messgröße ist generell die Zeit, die das Testsubjekt auf der rotierenden Stange verbringt. Der Rotarod-Test kann bei konstanter Geschwindigkeit oder mit Beschleunigungen durchgeführt werden (Shiutsuki et al., 2010). Vorteilhaft an diesem Test ist die Reliabilität der Testparameter zwischen verschiedenen Laboren und die Messung kann beobachterunabhängig objektiv durchgeführt werden. In dieser Testbatterie bot der Rotarod-Test eine praktikable Möglichkeit, die transgenen Tiere auf neurologische und motorische Auffälligkeiten zu überprüfen.

Die hierbei benutzte Testapparatur (3376-4R, TSE Systems, Bad Homburg) besteht aus vier voneinander abgetrennten Kammern, durch die eine rotierende Stange verläuft. Der Durchmesser der Stange beträgt 30 mm und die einzelnen Messplätze sind jeweils 85 mm breit. Die Oberfläche der Stange ist mit Einkerbungen versehen, so dass die Tiere einen verbesserten Halt finden. Etwa 20 cm unterhalb der Rolle befindet sich ein begrenzter Bodenbereich, welcher mit einer Berührungssensorik ausgestattet ist. Dieser detektiert ein von der Stange heruntergefallenes Tier. Um eine aversive Emotion im Versuchstier hervorzurufen, muss eine ausreichend große Fallhöhe gegeben sein. Ein zu großer Abstand könnte allerdings auch zu Verletzungen des Tieres führen.

In der genutzten Testapparatur (siehe Abbildung 5) ist es möglich, vier Tiere parallel zu testen. Vernetzt ist die Apparatur mit einem Computer, auf welchem mit einem speziellen Programm (TSE Rota-Rod V2.6) die Aufzeichnung vorgenommen werden kann. Anschließend kann hiermit auch die Exportierung der Daten in ein Excel-Format vorgenommen werden.

Die praktische Durchführung des Rotarod-Tests begann mit der Herausnahme der Testkäfige aus den Vorrichtungen und deren Platzierung auf dem Arbeitstisch. Anschließend wurden die Mäuse vorsichtig den Käfigen entnommen, anhand der Ohrmarkierungen identifiziert und in kleinere Plexiglasgefäße umgesetzt. Im Folgenden wurden die Mäuse auf die rotierenden Rollen platziert und der Test gestartet. Wir benutzten eine konstante Rotationsgeschwindigkeit von 10 Umdrehungen pro Minute ohne Beschleunigung. Sobald eine Maus von der Rolle herunter fiel, wurde sie möglichst schnell wieder auf die Rolle gesetzt und erhielt einen neuen Versuch.

Jede Maus hatte vier Versuche, die voreingestellte Maximalzeit von 120 Sekunden zu erreichen. Wurde die Zielzeit bereits vor dem 4. Versuch erreicht, erhielt das Testsubjekt trotzdem insgesamt vier Versuche auf dem Laufrad. Als Messvariablen wurden im Rotarod-Test die durchschnittliche Aufenthaltsdauer auf der rotierenden Stange, die

Anzahl der Versuche bis zum Erreichen der Zielzeit von 120 s sowie die auf der Stange verbrachte Zeit bis zum Erreichen der Zielzeit ausgewertet.

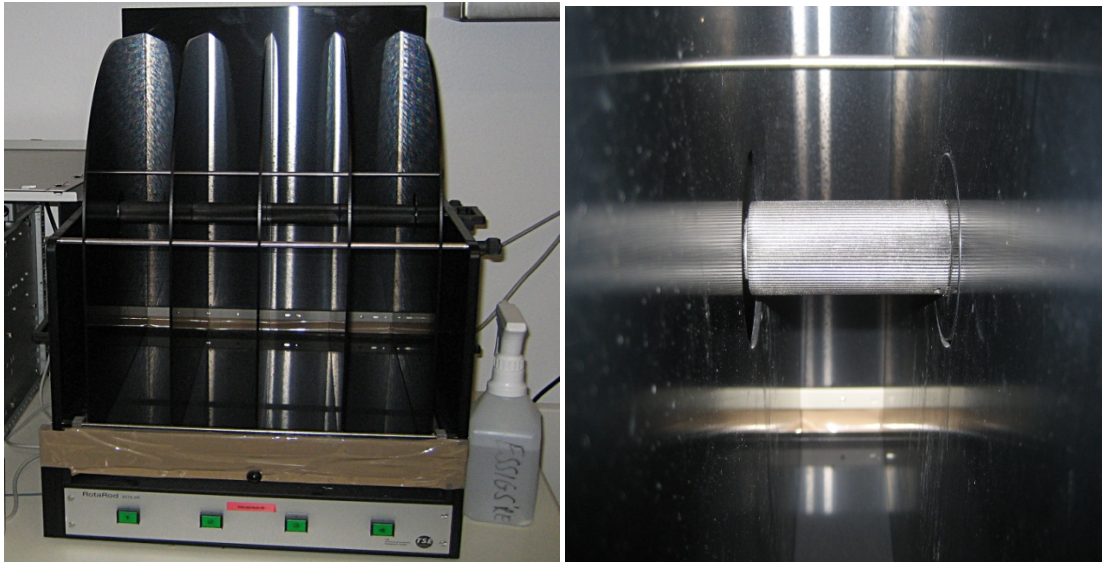


Abb. 5: Aufbau des Vier-Kammer-Rotarod-Apparats. Das Bild zeigt die Rotarod-Kammer mit Ansicht von vorne (links) und Detailansicht einer Kammer (rechts). Das Bild wurde freundlicherweise von Marlen Lunow, Marburg, zur Verfügung gestellt.

2.18 Offenfeldtest

Nach einer 48-stündigen Testpause folgte im Baseline-Testablauf der Offenfeldtest. Dieser Verhaltenstest stellt eine häufig genutzte Möglichkeit dar, das Erkundungsverhalten und die generelle Aktivität von Labortieren qualitativ und quantitativ zu erfassen. Eine erste Beschreibung eines solchen Tests mit Ratten erfolgte bereits 1934 durch Hall (Hall, 1934). Er bildet auch heute einen der populärsten und häufig verwendeten Verhaltenstests in der Forschung (Prut und Belzung, 2003). Die Gründe hierfür liegen in seiner einfachen Durchführbarkeit, der breiten Anwendbarkeit und der Möglichkeit, große Datenmengen einfach zu generieren (Geerse et al., 2006).

Das Grundprinzip des Tests besteht darin, ein Tier in einer ihm unbekannten Umgebung auszusetzen, aus welcher es nicht entkommen kann. Die Testarena bildet hierbei eine frei definierbare Fläche, die seitlich durch Wände abgeschirmt und nach oben offen ist (Walsh und Cummins, 1976). Das Verhalten des Tieres in diesem Raum wird beobachtet, aufgezeichnet und ausgewertet. Der Offenfeldtest macht eine Aussage über die unconditionierte lokomotorische Aktivität in einer für die Maus primär unbekannten, neutralen Umgebung. Diese induziert in der testnaiven Maus einen Konflikt zwischen Ex-

plorations- und Vermeidungsverhalten (Montgomery und Monkman, 1955; Stam et al., 1997).

Typische beim OFT erhobene Messgrößen sind Bewegungsparameter, wie zurückgelegte Distanz, Anteil von aktiver Bewegung, vertikale Aktivität (auch als Rearing bezeichnet), ortsabhängige Variablen (Eintritte, Zeit und Distanz im Zentrum bzw. der Peripherie einer Arena) und durch das vegetative Nervensystem stimulierte Messgrößen, wie die Anzahl der Fäkalboli und die Häufigkeit des Urinierens (Hall, 1934; Ivinskis, 1970; Archer, 1973; Walsh und Cummins, 1976; Prut und Belzung, 2003; Gould et al., 2007). Da die vegetativen Parameter stark von anderen Faktoren (Ess- und Trinkverhalten, Zeitpunkt der Messung) abhängig sind (Fonseca et al., 1976), wurden sie in der vorliegenden Untersuchung nicht erhoben.

Häufig wird der Offenfeldtest auch als Kontrollexperiment eingesetzt, um die Ergebnisse anderer Tests besser bewerten zu können (Stanford, 2006; Blizard et al., 2007; Gould et al., 2007). Andere Einsatzmöglichkeiten sind die Ermittlung von sedativen, toxischen oder stimulierenden Effekten von Substanzen (Gould et al., 2007). Der Offenfeldtest wurde auch zur Differenzierung des Verhaltens zwischen genotypisch unterschiedlichen Tieren benutzt (Ramos und Mormède, 1998).

Prinzipiell besteht der Aufbau des OFT aus einer kreisförmigen, rechteckigen oder quadratischen Fläche mit umgebender Begrenzung, die eine Flucht unmöglich macht. Üblicherweise wird das Versuchstier durch den Experimentator in die Testarena gesetzt und so zwangsweise mit der Testsituation konfrontiert. Die traditionelle Testlänge beträgt zwischen 2 und 10 Minuten. Solch eine relativ kurze Testzeit erfasst die stressbedingte Reaktion auf die neue Umgebung und die ermittelte motorische Aktivität kann in Zusammenhang mit angstassoziiertem Verhalten gebracht werden. Durch neuere, automatisierte Aufzeichnungsmöglichkeiten findet eine Tendenz zu längeren Monitoring-Intervallen statt, die Aussagen über die generelle lokomotorische Aktivität der Tiere liefern können (Blizard et al., 2007; Gould et al., 2007).

Der motorische Output, der Erkundungstrieb, die Angst von Mäusen vor Neuem und Unbekanntem (Neophobie) oder anderes angstassoziiertes Verhalten, Krankheit, Umgebungsvariablen (Beleuchtungsverhältnisse), der circadiane Rhythmus, genetische Manipulationen und Pharmaka beeinflussen das Testergebnis (Gould et al., 2007). Die gewählte geringe Beleuchtungsstärke (3 Lux) generiert bei den nachtaktiven Testtieren eine große motorische Aktivität.

Der Offenfeldtest liefert ferner valide Messgrößen für die Beurteilung einer Anxiolyse, da nach niedriger Dosis von klassischen Anxiolytika (Benzodiazepine) die lokomotorische Aktivität ansteigt. Tiere mit einer höheren Ängstlichkeit vermeiden außerdem den inneren Bereich der Testarena und halten sich wohl durch Thigmotaxis hauptsächlich an deren Rand auf (Ramos und Mormède, 1998; Prut und Belzung, 2003).

Mit Emotionalität assoziierte Parameter sind die Defäkationen, die verbrachte Zeit im Zentrum der Arena sowie die Aktivität des Testtieres innerhalb der ersten fünf Minuten. Durch den Separationsstress und die ausgelöste Agoraphobie in einer im Vergleich zum Käfig relativ großen und ungeschützten Arena kann die frühe Aktivität als valider Parameter für die Ängstlichkeit herangezogen werden (Katz et al., 1981; Gershenfeld und Paul, 1997; Carola et al., 2002). Der typische Aufbau eines OFT kontrastiert die natürliche Lebensweise von Mäusen im geschützten Bau und in sozialer Gemeinschaft.

Die Aussagekraft über die Ängstlichkeit des Tieres als Komorbiditätsfaktor sowie die Ähnlichkeit zur depressionsassoziierten motorischen Antriebslosigkeit machen ihn auch zu einem geeigneten Test zur Überprüfung depressionsähnlichen Verhaltens. Auch Antidepressiva sind im Offenfeldtest wirksam und bewirken eine Steigerung der lokomotorischen Aktivität (Kulkarni und Dandiya, 1973; Kalueff und Tuohimaa, 2004; Popa et al., 2010). Darüber hinaus kann der Offenfeldtest auch die Habituation eines Testtieres überprüfen. Nach wiederholter Darbietung eines gleichen Testfeldes sinkt normalerweise die Explorationsaktivität (Dixan und Defries, 1968; Bolivar et al., 2000; Schilwein et al., 2002).

Im Offenfeldtest erfolgt die Messung der horizontalen Wegstrecke entlang der x- und y-Koordinaten. Die vertikale Strecke wird nach der z-Koordinate gemessen. Die vertikale Wegstrecke bestimmt das Aufrichtverhalten der Mäuse, das sogenannte „rearing“. Die Auswertung dieses Verhaltens erlaubt einen Schluss auf die Emotionalität der Tiere, wobei das Rearing mit der horizontalen Aktivität korrelieren kann (Thiel et al., 1999; Pawlak und Schwarting, 2002).

Für das Erfassen der Aktivität im Offenfeldtest gibt es unterschiedliche Methoden. Eine historische Methode ist das Zählen der Überquerungen auf dem Boden befindlicher horizontaler Linien durch einen Beobachter. Eine weitere Methode ist die automatische Erfassung der Unterbrechungen von Infrarotlichtschranken durch das Versuchstier (Koob et al., 2006). Eine aktuelle Methode beinhaltet das Aufzeichnen der Bewegungen

des Testtieres durch eine Videokamera und deren digitale Analyse durch eine Computersoftware (Schwarz et al., 2002).

Die Anwendung des Offenfeldtests bei STAT1^{F77A}-Mäusen erfolgte hauptsächlich zur Kontrolle des Einflusses der Mutation auf das lokomotorische und angstbezogene Verhalten. Die im Verhaltenslabor des BMFZ installierte Anlage (Hersteller Peter Muth-Feinmechanik; siehe Abbildung 6) besteht aus jeweils zwei Testapparaten, die beide aus einer Grundplatte mit vier quadratischen Boxen bestehen. Die Boxen sind durch eine silberfarbene, metallische Bodenplatte (50x50 cm) und seitlich durch herausnehmbare weiße Plastikplatten (40 cm) begrenzt. Um das Aufrichtverhalten der Testtiere zu detektieren, sind in ca. 8 cm Höhe seitlich an jeweils zwei gegenüberliegenden Seiten Lichtschrankeneinheiten (Light Lines, 50 cm lang, 5 cm breit, Fa. Biobserve) angebracht. Oberhalb des Testfeldes ist eine Beleuchtungsanlage installiert, welche über eine Streulichtscheibe und jeweils vier darüber liegende Lampen eine indirekte Beleuchtung des Testfeldes ermöglicht. In der Mitte der Streulichtscheibe befindet sich das Kamerasystem, wobei der Abstand der Kamera vom Testplattenboden ca. 1,5 m beträgt. Unterhalb jeder Arena befinden sich zusätzlich Stehlampen, welche eine weitere indirekte Beleuchtungsquelle darstellen. Die automatisierte Tracking-Software Viewer der Firma Biobserve ermöglicht über das Kamerasystem eine sehr genaue Aufzeichnung des motorischen Verhaltens der Testtiere. Das angstassoziierte Verhalten wurde mittels des Programms ausgewertet, indem eine virtuelle zentrale Zone von 25% der Gesamtfläche in die Arenen gelegt wurde.

In der Durchführung des Offenfeldtests wurden die Versuchstiere initial zur Akklimatisierung in den Testraum gebracht. Vor Beginn wurden die Arenen mit einprozentiger Essigsäure gereinigt und die Lichtverhältnisse eingestellt. Außerdem wurden alle nötigen Voreinstellungen im Programm-Viewer durchgeführt. Auf der Arbeitsfläche waren die bereits beschriebenen Plexiglasboxen aufgestellt. Zunächst wurden die Mäuse gewogen und anschließend in die Boxen platziert. Vor dem Teststart wurden die Parameter im Computerprogramm nochmals überprüft und danach der Testversuch durch zügiges Platzieren der Mäuse in die Mitte der Arenen begonnen. Sobald sich alle Mäuse in den Arenen befanden, wurde die Aufnahme am PC gestartet. Nach Ablauf der Testzeit von 30 Minuten beendete die Software automatisch die Aufzeichnung. Hierauf wurden die Mäuse aus den Testarenen entfernt und in ihren Käfigen platziert.

Als Parameter der motorische Aktivität im Offenfeldtests über die gesamte 30-minütige Testzeit wurden die zurückgelegte Distanz, die prozentuale Aktivität und die Anzahl an Beschleunigungsvorgängen der Versuchstiere ausgewertet. Darüberhinaus wurden die Anzahl der Rearings sowie die mittlere Rearing-Dauer in die Analyse eingeschlossen. In der angstassoziierten Analyse des Baseline-Offenfeldtests kamen die motorischen Parameter der zurückgelegten Distanz und prozentualen Aktivität innerhalb der ersten 5 Testminuten zur Auswertung. Daneben wurden die Eintritte in die äußere und innere Zone der Testarena sowie die Gesamtdistanz und Aufenthaltsdauer der Testtiere in der inneren Zone analysiert.

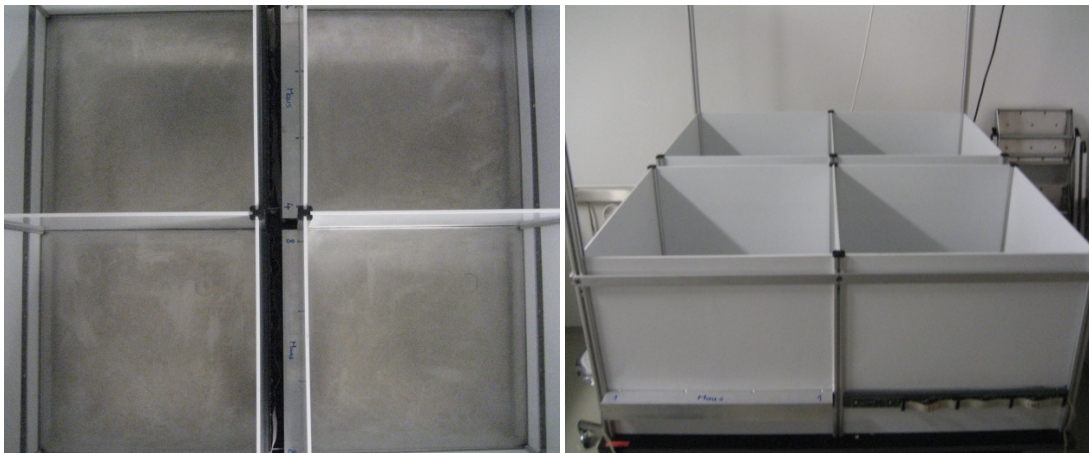


Abb. 6 Aufbau der Offenfeldtest-Anlage. Offenfeldtest-Anlage mit Blick von oben (links) und von vorne (rechts). Die Aufnahmen aus dem Marburger Verhaltenslabor stammen von Marlen Lunow.

2.19 Sozialer Interaktionstest

Der soziale Interaktionstest (SIT) wurde ursprünglich zur Erfassung von ängstlichem Verhalten bei männlichen Ratten entwickelt (File und Hyde, 1978). Hierbei bestand der besondere Aspekt darin, dass die Angst durch einen natürlichen Faktor in Form der sozialen Interaktion ausgelöst wird. Wasser- und Futterentzug oder Elektroschocks wurden durch diese Entwicklung überflüssig.

Die abhängige Variable dieses Verhaltenstests ist die Zeit, welche beide Testpartner in räumlicher Nähe zueinander verbringen. Im Speziellen kann es sich um gegenseitiges Beschnüffeln, Verfolgen oder Putzen handeln. Aggressive Verhaltensweisen, wie Besteigen oder Beißen, wurden insgesamt selten beobachtet. Es gilt für den sozialen Interaktionstest als vorteilhaft, wenn sich die Testpartner in einer neutralen Umgebung befinden, weshalb der Aufbau des Offenfeldtests als Apparatur gewählt wurde. Als zwei-

ter Parameter wird gewöhnlich die lokomotorische Aktivität der beiden Testpartner ermittelt. Da sich beiden Tiere gegenseitig beeinflussen, müssen sie zusammen als Einheit ausgewertet werden (File und Seth, 2003).

In vielen Studien gibt es Hinweise darauf, dass eine Erhöhung der sozialen Interaktion eines Paares ohne gleichzeitige Erhöhung der motorischen Aktivitäten für einen anxiolytischen Effekt spricht. Ferner gilt, dass eine spezifische Abnahme der sozialen Interaktion einen anxiogenen Effekt andeutet (File und Seth, 2003).

Der Test kann grundsätzlich unter unterschiedlichen Bedingungen durchgeführt werden. Die Haltungsbedingungen, die Beleuchtungsstärke und Vertrautheit mit der Testarena spielen hierbei eine Rolle (File und Seth, 2003). Helle Lichtverhältnisse und eine unbekannte Testarena erzeugen den höchsten Grad an Furcht, wohingegen eine bekannte Umgebung und wenig Licht bei den Testtieren am wenigsten Angst auslösen. Der SIT war somit der erste Test, der sowohl erhöhtes wie auch erniedrigtes Angstniveau detektieren konnte. Neben der Anwendung des Tests bei Ratten zeigten mehrere Studien, dass der SIT auch bei Mäusen valide Ergebnisse liefert (File und Seth, 2003).

Der soziale Interaktionstest wird ferner in der Literatur (Krishnan und Nestler, 2008) als Test für depressives Verhalten beschrieben, da er den Endophänotyp des sozialen Rückzugs gut abbildet. Die Gabe von Endotoxin oder anderen immunstimulierenden Substanzen verkürzt die Interaktionszeit von Testmäusen deutlich, entsprechend besitzt er auch im Zytokin-induzierten depressionsähnlichen Verhalten einen Stellenwert (Fishkin und Wislow, 1997; Fu et al., 2010).

Aufgrund der Testreihenfolge war den Versuchstieren der grundsätzliche Aufbau der Testarenen bereits bekannt. Auch die relativ dunklen Lichtverhältnisse (3 Lux) waren identisch mit dem Ablauf des Offenfeldtests. Diese Voraussetzungen sollten für einen hohen Grad an sozialer Interaktion sorgen und mögliche Unterschiede zwischen den Genotypen deutlich machen. Aus tierschutzrechtlichen, ökonomischen sowie logistischen Gründen wurde auf die Durchführung des SIT bei einer zusätzlichen Kohorte mit Wildtyp/Wildtyp-Maus-Interaktion verzichtet. Die für den Vergleich mit den transgenen Tieren notwendigen Daten entstammen der Publikation von Matsuo und Kollegen (2010). Der SIT liefert in der Phänotypisierung der STAT1^{F77A}-Mäuse Hinweise auf das soziale Interaktions-, angstassoziierte und depressionsähnliche Verhalten.

Da die Testapparatur des sozialen Interaktionstests dem Testaufbau des Offenfeldtests entspricht, waren die Versuchstiere bereits an die Umgebung habituiert und der SIT

konnte bereits 24 h später erfolgen. In der Durchführung des sozialen Interaktionstests wurden jeweils Wildtyp-Tiere mit transgenen Mäusen verglichen ($\text{STAT1}^{\text{WT/WT}}$ mit $\text{STAT1}^{\text{F77A/WT}}$ sowie $\text{STAT1}^{\text{WT/WT}}$ mit $\text{STAT1}^{\text{F77A/F77A}}$). In den einzelnen Arenen wurden jeweils Testpaare von sich unbekannten Tieren gebildet.

Einige Publikationen schlagen eine Einzelhaltung der Testtiere kurz vor den Experimenten vor. Hiervon versprach man sich eine erhöhte soziale Interaktion (File und Seth, 2003). Allerdings zeigte sich ebenfalls, dass die Entfernung von Tieren aus einer existierenden Kohorte einen schnell wirksamen und potenten Stressor für die entnommenen und die im Käfig verbleibenden Tiere darstellt (Kask et al., 2001). Aufgrund des zusätzlichen Stresses und der logistischen und zeitlichen Problematik, die solch eine Vorgehensweise mit sich bringt, wurde auf sie verzichtet.

Die Vorbereitung des sozialen Interaktionstests entsprach den Abläufen des Offenfeldtests, wobei die Testpartner der Experimentalgruppentiere zufällig ausgewählt wurden. Über die drei Testzeitpunkte hinweg erfolgte ein zufälliger Wechsel, allerdings erhielt kein Tier einen aus einem vorherigen Versuch oder Haltungskäfig bereits bekannten Partner.

Aufgrund des optischen Störpotentials blieben die Rearing-Sensoren bei diesem Test ausgeschaltet. Um einen optimalen Differenzierungseffekt zu erhalten, wurden die Kontrolltiere zuerst in die Arenen gesetzt. Hierdurch kann das Programm beide Testpartner differenzieren. Erst nach dem Einsetzen beider Versuchstiere wurde der Test am PC gestartet. Nach Ablauf der 30-minütigen Testzeit wurden die Tiere anhand der Ohrmarkierungen identifiziert und wieder in ihre Heimkäfige gesetzt.

Sämtliche Auswertungen des SIT entstanden durch Reanalyse der aufgezeichneten Videos. Die erhobenen Messgrößen dieses Verhaltenstests waren die Anzahl und Gesamtdauer der sozialen Interaktionen beider Testpartner. Grundsätzlich bestand auch Möglichkeit, die motorische Aktivität der Testtiere zu erfassen. Aufgrund des begrenzten optischen Auflösungsvermögens, der beschränkten Rechenleistung des verwendeten Computers und der Notwendigkeit in einer Arena zwei Tiere zu detektieren, zeigte sich die Auswertung der motorischen Analyse sehr störanfällig. Aus diesem Grund wurde darauf verzichtet.

2.20 Forced-Swim-Test

Den Abschluss der Testbatterie bildete der physisch und psychisch anstrengende Forced-Swim-Test (FST). Dieser Verhaltenstest ist eine der am weitesten verbreiteten tierexperimentellen Methoden zur präklinischen Bestimmung von antidepressiver Aktivität (Borsini und Meli, 1998; Cryan und Mombereau, 2004). Dies liegt an seiner einfachen Durchführung, der großen Reliabilität zwischen unterschiedlichen Laboren und der Möglichkeit, ein breites Spektrum an antidepressiven Pharmaka testen zu können (Cryan und Mombereau, 2004; Hascoet und Bourin, 2009). Auch für die Verhaltensforschung genetisch veränderter Tiere stellt dieser Verhaltenstest die wichtigste Methode dar, depressive oder antidepressive Phänotypen zu erkennen und zu evaluieren (Cryan et al., 2002; Cryan und Mombereau, 2004; Petit-Demoulière et al., 2005). Neben der klassischen Anwendung als Screeningmethode für neue Antidepressiva, ist die Messung des spezifischen depressionsähnlichen Verhaltens im FST in den letzten Jahren in den Vordergrund getreten (Moreau et al., 2008; O'Connor et al., 2009a; O'Connor et al., 2009b).

Ursprünglich wurde der Verhaltensversuch für Ratten entwickelt und kurze Zeit später für Mäuse modifiziert (Porsolt et al., 1977a; Porsolt et al., 1977b; Porsolt et al., 1978a; Porsolt et al., 1978b). Das Grundprinzip der Testprozedur besteht darin, eine Maus in einen Behälter mit Wasser zu setzen und ihr Verhalten zu beobachten. Durch den Aufbau schafft man für sie eine Testsituation, aus der sie unmöglich entfliehen kann. Das stellt für die Maus einen großen physischen und psychischen Stressor dar. Prinzipiell lassen sich drei Verhaltensweisen während eines FST bei Nagetieren beobachten. Hierbei handelt es sich um „Struggling“, „Swimming“ und „Floating“. Der Begriff des Strugglings beschreibt eine Verhaltensweise der Testmaus, die unter Benutzung der Vorder- und Hinterbeine aktiv das Testgefäß zu verlassen versucht und dabei die Vorderbeine über der Wasseroberfläche erhebt. Beim Swimming bewegt die Maus alle vier Extremitäten, führt allerdings nur horizontale Aktivität aus. Nach der Definition von Porsolt und Kollegen liegt beim Floating- oder Immobilitätsverhalten eine Einstellung der Aktivität vor und die Maus führt lediglich die nötigsten Bewegungen durch, um den Kopf oberhalb der Wasseroberfläche zu halten (Porsolt et al., 1977a; Porsolt et al., 1977b).

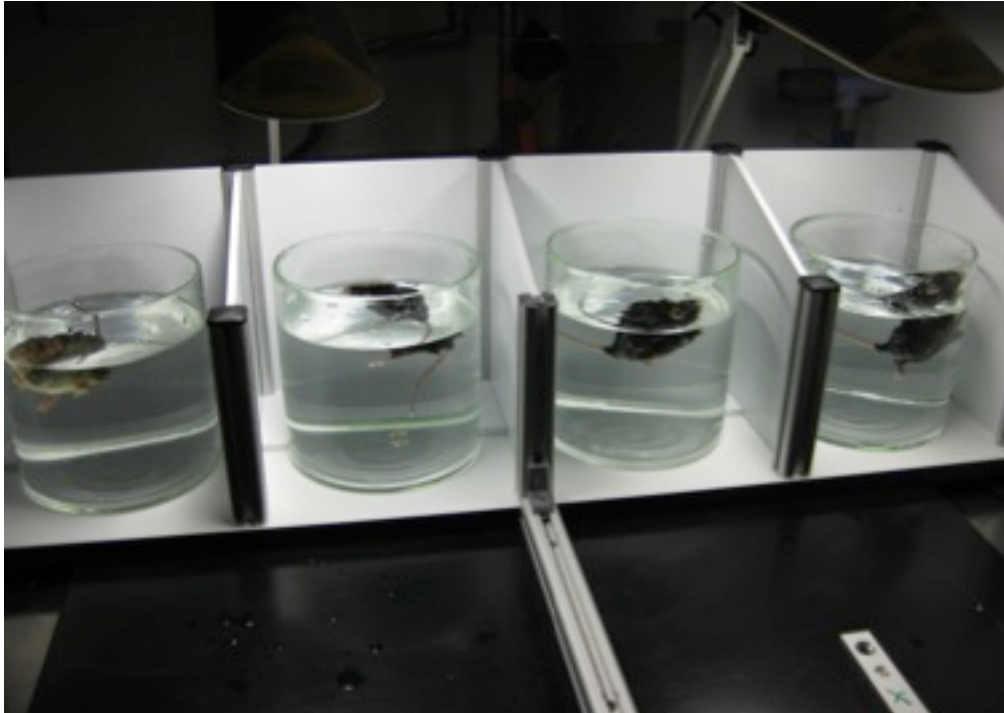


Abbildung 7: Versuchstiere in der FST-Apparatur. Das Bild zeigt beispielhaft das Verhalten der Versuchsmäuse im Forced-Swim-Test in der genutzten Apparatur. Die drei linken Tiere zeigten zum Aufnahmezeitpunkt Floating-Verhalten, die rechte Maus Struggling.

Während des Testablaufs ändert die Versuchsmaus gewöhnlich ihr Verhalten vom aktiven Struggling zum immobilen Floating. Diese Verhaltensänderung wird als depressionsähnliches Verhalten gewertet, wenn die Latenz bis zum Einsetzen der Immobilität und die Dauer des Floatings sich signifikant von gleichaltrigen Wildtypmäusen unterscheidet. Je früher und länger die Tiere sich immobil zeigen, desto stärker wird ihr Verhalten als depressiv eingestuft (Porsolt et al., 1977a; Cryan und Mombereau, 2004; Petit-Demoulière et al., 2005).

Als Basis des Tests diente die Beobachtung, dass Ratten in einem Wasserlabyrinthtest ohne Fluchtmöglichkeit eine Position der Passivität und Immobilität einnehmen. Eine erneute Konfrontation mit dieser Testsituation lässt die Ratten sehr viel schneller in diese Verhaltensweise wechseln. Dieser Effekt zeigte sich durch gängige Antidepressiva reversibel (Porsolt et al., 1978a). Zur Erweiterung des pharmakologischen Detektionsspektrums des FST auf selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmern (SSRIs) modifizierten mehrere Arbeitsgruppen die Wassertiefe und erfassten das vorherrschenden Verhalten innerhalb von 5-sekündigen Zeitintervallen (Detke et al., 1995; Petit-Demoulière et al., 2005). Aus unbekannten Gründen reicht bei Mäusen im Gegensatz zu Ratten eine Testexposition aus, um einen antidepressiven Effekt zu detektieren. Die modifizierte Form des FST ist für das Screening von Antidepressiva der zurzeit zuver-

lässigste Test, wobei dieser Variante auch eine große prädiktive Validität attribuiert wurde, da er sich für die meisten pharmakologischen und nicht-pharmakologischen Antidepressiva sensitiv zeigte, ohne auf Neuroleptika und Anxiolytika zu reagieren (Borsini und Meli, 1988; Hascoet und Bourin, 2009).

Die Immobilität im FST lässt sich durch die genetische Prädisposition, Stresseffekte, immunologische Aktivierung und Drogenentzug beeinflussen. Zusätzlich ändern Alterationen der Nahrungsaufnahme und des Schlafverhaltens sowie pharmakologische und nichtpharmakologische antidepressive Behandlung das Verhalten der Versuchstiere im FST. Da diese Einflüsse auch in der humanen Depression eine wichtige Rolle spielen, präsentiert sich der FST nicht nur als gutes Modell zur Einschätzung von depressionsassoziierten Faktoren, sondern gewinnt auch an ätiologischer Validität (Cryan und Mombereau, 2004). Diese Annahme unterstützt die Korrelationen der Immobilitätszeiten im FST von Nagetieren, die auch vermehrte Freudlosigkeit bzw. Anhedonie in entsprechenden Testsituationen zeigten.

Andere Immobilitäts-beeinflussende Parameter sind in einer Übersicht von Petit-Demoulière und Mitarbeitern (2005) ausführlich dargestellt worden. Hierzu gehören die Tiefe, der Durchmesser der Testgefäße und die Temperatur des Wassers (Detke und Lucki, 1996; Bächli et al., 2008). Weitere Faktoren, die zusätzlich bei der Analyse und Übertragbarkeit zwischen Laboren in Betracht gezogen werden müssen, sind: Alter der getesteten Mäuse, Umgebung der Testarena, zirkadianer Rhythmus der Tiere, die Testzeit, freier oder restriktiver Zugang zu Futter, Haltung der Testtiere (Einzel- oder Gruppenhaltung) und der Mäusestamm (Petit-Demoulière et al., 2005). Die zahlreichen Einflussfaktoren verdeutlichen die Bedeutung einer ausreichend großen und unter gleichen Bedingungen gehaltenen Kontrollgruppe. Besondere Wichtigkeit besitzt auch die Art der Datengewinnung. Diesem Zweck diene in der vorliegenden Arbeit eine automatische Videoauswertung mithilfe eines Software- Programms. Für diese Systeme konnte belegt werden, dass sie verlässliche Ergebnisse generieren (Kurtuncu et al., 2005).

Die Ansichtsvalidität des FST wird durch die innerhalb weniger Minuten auftretenden Verhaltensänderungen nach antidepressiver Therapie gemindert. Allerdings sind auch chronisch applizierte, geringe Dosen bei Ratten effektiv (Detke et al., 1997; Renieric et al., 2002). Trotzdem ist die Konstruktvalidität des FST aufgrund einer uneinheitlichen Wertung des Immobilitätsverhaltens schwierig einzuordnen. Porsolt beschrieb diesen Zustand als verhaltensgeäußerte Hoffnungslosigkeit („behavioral despair“), die einen

Zustand reduzierter Stimmung wiedergibt, da das Tier die Hoffnung auf Flucht aufgegeben hat (Porsolt et al., 1977a). Andere Interpretationen gehen von einem evolutionär konservierten Übergang von aktivem zu passivem, energiesparenden Coping-Verhalten aus (Thierry et al., 1984; Arai et al., 2000; Holmes, 2003). Das korrespondiert mit dem psychologischen Konzept des Eingeschlossen-Seins („entrapment“), welches bei klinisch depressiven Patienten häufig auftritt (Cryan und Mombereau, 2004). Allerdings könnte die Immobilität auch als adaptive Antwort der Testtiere auf eine unausweichliche Situation interpretiert werden und daher eher ein erfolgreiches als ein unangemessenes Coping ausdrücken (West, 1990). Da die Effekte bereits ab der ersten Exposition sichtbar werden, liegt prinzipiell nur ein innerhalb der Testsituation erlerntes Verhalten vor. Allerdings treten auch Adaptions- und Habituationsprozesse zwischen verschiedenen Testzeitpunkten auf (Parra et al., 1999).

Zusammenfassend modelliert der FST ein spezifisches Cluster an Symptomen als Reaktion auf akuten Stress, das nur begrenzt ätiologische Vergleichbarkeit mit der menschlichen Depression besitzt (Redrobe und Bourin, 1999; David et al., 2001; Willner und Mitchell, 2002). Er stellt kein gutes Simulationsmodell für die Depression dar, zeigt sich überdies als sehr sensitiv für die Effekte von Antidepressiva (Holmes, 2003), und wurde in der vorliegenden Arbeit deshalb zur Detektion von depressionsähnlichem Verhalten eingesetzt.

Der experimentelle Aufbau des FST wurde im Vergleich zur ursprünglichen Version des Porsolt-Forced-Swim-Tests modifiziert (Lucki et al., 1997; Porsolt, 2000). Im Verhaltenslabor des BMFZs steht eine eigene Apparatur mit zwei Testkameras und vier Testplätzen zur Verfügung (Peter Muth-Feinmechanik), wobei eine Kamera auf zwei Testplätze ausgerichtet ist. Die Testapparatur besteht aus einer rechteckigen, seitlich und hinten mit weißem Plastikmaterial abgeschirmten Vorrichtung für die gläsernen Testbehälter (Modell DURAN, Fa. Schott). Die Abschirmung verbessert den Kontrast für die optische Auswertung und verhindert einen Blickkontakt zwischen den Mäusen.

Die zylinderförmigen Glasgefäße sind 14,5 cm hoch und ihr Durchmesser beträgt ebenfalls 14,5 cm. Sie wurden vor Testbeginn bis ungefähr 11 cm Höhe mit 23°C-24°C warmen Frischwasser aufgefüllt. Die Zylinder sind herausnehmbar und konnten nach jedem Testdurchgang gereinigt sowie neu gefüllt werden. Die Übertragung der Videosequenzen von den Kameras zu dem im Verhaltenslabor installierten Computer ermöglicht die Aufzeichnung und Auswertung der Daten mithilfe des Programms „High

Throughput Forced Swimming Test“ der Firma Biobserve. Das Programm benötigt die Einstellung von Schwellwerten der Höhenkoordinate, um die unterschiedlichen Verhaltensmuster zu erkennen. Die Beleuchtung der Testbehälter erfolgt durch eine Stehlampe von schräg oben (siehe Abbildung 8). Sie wurde so gewählt, dass die Testfelder einen ausreichenden optischen Kontrast liefern, ohne allerdings zusätzlich Angst durch eine zu helle Beleuchtung bei den Testtieren zu provozieren. Die Wasserhöhe musste so eingestellt werden, dass die Mäuse nicht mit dem Schwanz oder den Beinen den Boden des Gefäßes berühren konnten. Das ist eine wichtige Voraussetzung für die korrekte Durchführung der modifizierten Version des FST (Petit-Demoulière et al., 2005).

Die praktische Durchführung des FST begann mit der Überführung der Mäuse in ihren Käfigen aus dem Haltungsbereich zur Akklimatisierung in das Verhaltenslabor. Nach der Aktivierung der Computersoftware und dem Ausrichten der Kameras wurden die Zylinder gesäubert und mit Frischwasser gefüllt, wobei auf die korrekte Temperatur (Thermometer GTH, Fa. Greissinger) sowie die richtige und gleiche Wasserhöhe bei allen Gefäßen geachtet wurde. Anschließend wurde in einer Offenfeldtestarena eine Erholungszone mit frischen Käfigen unter einer Infrarotwärmelampe eingerichtet. Nach der Identifikation der Testmäuse wurden sie in kleinere Plexiglaskäfige aufgeteilt. Bei jedem Testdurchgang erfolgte die simultane Beobachtung von vier Mäuse über die Testzeit von sechs Minuten.

Nach der Eingabe der Schwellwerte und Angleichung der Wasserhöhe wurde der Versuch für jedes Testgefäß getrennt am PC manuell gestartet. Dies geschah unmittelbar nachdem die Maus in das Wasser gesetzt wurde. Nach Testende konnten die Mäuse einzeln aus den Gläsern entnommen und mit einem Zellstoff getrocknet werden. Die erschöpften Testtiere kamen anschließend in eine Ruhebox, wo sie sich für mindestens 6 Minuten ausruhen und erwärmen konnten. In der Zwischenzeit wurde der Test mit der nächsten Testgruppe gestartet. Dazu musste das Wasser der Testgefäße durch Frischwasser ersetzt werden. Dies ist notwendig, um Defäkationsrückstände und Duftmarken von vorher getesteten Tieren zu entfernen. Nachdem die Mäuse getrocknet und erholt waren, kehrten sie wieder in ihre gewohnte Haltungsumgebung zurück.

In der statistischen Analyse des FST wurden die Zeitdauer und Anzahl der Episoden der Verhaltensparameter (Floating, Swimming, Struggling) ausgewertet. Zusätzlich wurde eine klassische Auswertung nach Porsolt und Kollegen vorgenommen, die eine Analyse der Floating-/Immobilitätszeit in den letzten vier Minuten einschließt. Mit Hilfe eines

Split-Half-Tests ließen sich beide Testhälften getrennt analysieren. Die Messung der Latenz bis zum Einsetzen der Immobilität (Castagné et al., 2009) war aufgrund der technischen Voraussetzungen des benutzten Programms nicht möglich.

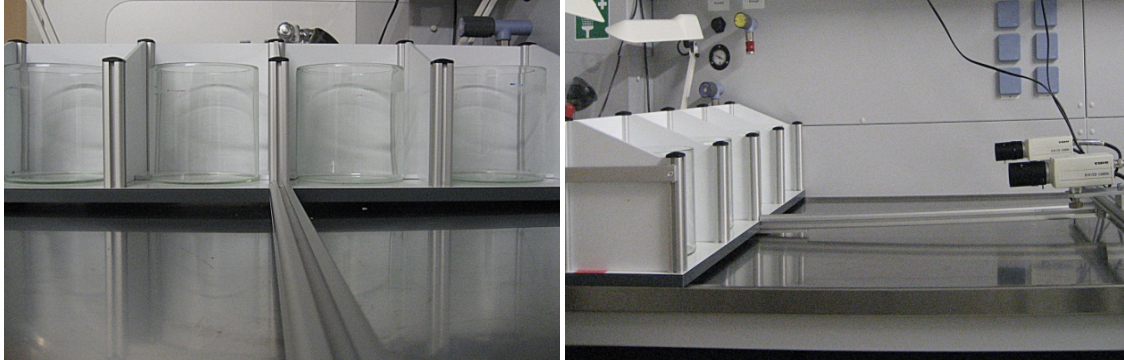


Abb. 8: Testanlage des Forced-Swim-Tests. Ansicht aus der Kameraperspektive (links) und von seitlich (rechts) (Bilder von Marlen Lunow).

2.21 Lipopolysaccharid-Exposition

Der Überlebenstest überprüfte den Einfluss des Transkriptionsfaktors STAT1 und der STAT1^{F77A}-Variante auf das Überleben von Testmäusen nach einer Lipopolysaccharid-Exposition. Die intraperitoneale Injektion von aus *E. coli* aufgereinigtem Lipopolysaccharid induziert in tierischen Organismen eine Reaktion, die der gramnegativen Sepsisreaktion des Menschen ähnlich ist. Es kommt hierbei zu einer überschießenden Immunreaktion durch die massive Produktion von Zytokinen und Stickstoffmonoxid (NO), entsprechend versterben die Tiere im vasodilatorischen Kreislaufversagen. Es konnte bereits dargelegt werden, dass Tiere mit defizientem STAT1-Weg eine erhöhte Überlebenswahrscheinlichkeit im Rahmen einer gramnegativen Sepsis aufweisen (Varinou et al., 2003; Kamezaki et al., 2004). Im Falle einer reduzierten Proteinexpression der Interferon-vermittelten Gene sollte dieser Versuch möglicherweise vergleichbare Ergebnisse generieren.

Im Überlebenstest wurden jeweils 24 STAT1^{F77A/F77A}- und 24 STAT1^{WT/WT}-Tiere im Alter von fünf bis sieben Monaten verwendet. Jeweils zwölf Mäuse beider Genotypen wurden mit Lipopolysaccharid infiziert, die übrigen Tiere erhielten eine Kontrollbehandlung. Die Durchführung begann mit der Erfassung des Körpergewichts. Anschließend erfolgte die Behandlung der Versuchstiere im Haltungsbereich unter dem Abzug einer Tierumsetzungsstation. Durch eine intraperitoneale Injektion in den linken, unteren abdominellen Quadranten wurden die Tiere entweder mit 300 µg Lipopolysaccharid

oder mit einem äquivalenten Volumen 0,9% NaCl-Lösung behandelt. Unmittelbar anschließend kehrten die Tiere in ihre gewohnte Haltungsumgebung zurück. Die Überlebensrate und die Ergebnisse von klinischen Beobachtungen wurden täglich über eine zehntägige Testzeit dokumentiert.

Zur Bestimmung des krankheitsassoziierten und depressionsähnlichen Verhaltens wurden die durch LPS-stimulierten Verhaltensänderungen im Offenfeldtest erfasst. Die systemische Applikation von LPS ist ein etabliertes Modell zum Studium der physiologischen Änderungen nach peripherer Immunaktivierung und induziert die klassischen Symptome des Sickness-Behavior (Yirmiya, 1996; Lacosta et al., 1999; Dantzer et al., 2008). Nach der Infektion mit LPS kommt es zu einer langanhaltenden Entzündungsreaktion im ZNS (Qin et al., 2007), die depressionsähnliche Verhaltensänderungen hervorrufen kann. Beschrieben sind Körpergewichtsabnahme, reduzierte Exploration im Offenfeldtest, zurückgehende soziale Interaktionen und eine erhöhte Immobilität im Forced-Swim-Test (Yirmiya, 1996; Larson und Dunn, 2001; Fu et al., 2010).

Die Testung auf Zytokin-induziertes Sickness-Behavior oder depressionsähnliches Verhalten im Tiermodell birgt die Problematik, dass die Ergebnisse von depressionsassoziierten Tests durch eine beeinträchtigte motorische Aktivität gestört werden. Einige Autoren umgehen diese Schwierigkeit durch den Einsatz von langsam wirksamen Pathogenen wie BCG (Lestage und Castanon, 2008; Moreau et al., 2008) oder durch repetitive Testung eines Tieres über einen längeren Zeitraum. Gemäß aktueller Vorstellung tritt Sickness-Behavior bis zu 24 h nach Infektion mit einem Maximum nach 4-6 h auf. Dieses Modell fand bereits für die LPS-induzierte Depression Verwendung (Frenois et al., 2007; Dantzer et al., 2008; Moreau et al., 2008; O'Connor et al., 2009b; Fu et al., 2010).

Der Offenfeldtest wird standardmäßig als Screeningtest für psychomotorische Aktivität und Exploration eingesetzt, denn er eignet sich gut, um das Maß an Krankheitsverhalten über einen Zeitraum zu quantifizieren (Thiel et al., 1999; Pawlak und Schwarting, 2002; Bauhofer et al., 2004; Bauhofer et al., 2009). Neben der Messung des Sickness-Behavior detektiert der OFT auch depressions- und angstassoziierte Parameter (Holmes, 2003; Kalueff und Tuohimaa, 2004). Aus organisatorischen Gründen war es lediglich möglich, einen Test pro Tag durchzuführen und aufgrund der breiten Anwendbarkeit fiel die Wahl auf den Offenfeldtest.

Zur Quantifizierung und Objektivierung der Symptome des Sickness-Behavior bzw. des Zytokin-induzierten depressionsähnlichen Verhaltens wurde ein Vergleich zwischen der

Kontrollgruppe der Wildtyp-Tiere mit zwei transgenen Gruppen (STAT1^{F77A/WT} und STAT1^{F77A/F77A}) und zwei Behandlungen (NaCl und LPS) durchgeführt. An den Testtagen wurde hierfür das Körpergewicht erhoben und ein 15-minütiger Offenfeldtest durchgeführt. Die Testabfolge ist in Tabelle 5 dargestellt.

In der praktischen Durchführung wurden insgesamt 59 testnaive Mäuse im Alter von 8-9 Wochen eingesetzt. Jeweils zehn Mäuse der jeweiligen Genotypen wurden den einzelnen Gruppen zugeteilt, wobei durch „matching“ auf eine möglichst homogene Verteilung der Tiere geachtet wurde. Tiere aus einem Wurf wurden gleichmäßig nach dem Zufallsprinzip auf die Behandlungsgruppen verteilt. Die Aufteilung der Testtiere nach Anzahl und Genotyp ist in Tabelle 7 dargestellt. Am ersten Tag wurde das Ausgangsgewicht der testnaiven Mäuse erfasst und danach ein Baseline-Offenfeldtest durchgeführt. Unmittelbar anschließend folgte die Behandlung der Kontroll- und Testtiere durch eine Injektion in den linken unteren abdominellen Quadranten bei hygienisch verbesserten Bedingungen unter Dauerabzug in der Tierumsetzungsstation im Tierhaltungsraum. Als Reagenz für die Testgruppe wurde Lipopolysaccharid (LPS) in der Dosierung 5 mg/kg Körpergewicht verwendet. Die Kontrollgruppe erhielt im gleichen Laborraum und zum gleichen Zeitpunkt ca. 100 µl 0,9% sterile NaCl-Lösung. Um eine stabile Injektionsposition zu erlangen, wurde die Maus entlang der Wirbelsäule und im Nacken gegriffen. Nach der Behandlung wurden die Testmäuse alle 24 h bis zum Tag 6 zwischen 8 und 12 Uhr vormittags im Offenfeldtest beobachtet. Die Verhaltensbeobachtung an Tag 10 diente der Aktivitätserfassung der rekonvaleszenten Tiere.

Genotyp	Kontrollgruppe			Behandlungsgruppe		
	WT/WT	F77A/WT	F77A/F77A	WT/WT	F77A/WT	F77A/F77A
Anzahl (n)	10	10	10	10	10	9

Tabelle 7: Aufteilung der Testtiere nach Genotyp und Behandlungsgruppe. Durch einen Sterbefall weist die LPS-Behandlungsgruppe der transgenen STAT1^{F77A/F77A}-Mäuse nur neun Mitglieder auf.

2.22 Verhaltensanalyse mittels Videotracking

Die Software der Fa. Biobserve erkannte durch eine Videotracking-Analyse vollautomatisch das Verhalten der Versuchstiere. Das Programm Viewer II diente der Auswertung des OFT und SIT. Für die Beurteilung des FST wurde das Programm „High Throughput Forced Swim Test Analysis“ angewendet. Diese Software ermöglichte es, Verhaltensexperimente ohne die Nachteile künstlicher Aufbauten und des menschlichen Beobachters durchzuführen. Das Videosignal wurde nach analog-digital Wandlung (Canopus, ADVC-50) an den vernetzten Computer übertragen. Durch eine Filter-Kontrast-Methode identifizierte das Programm die Position und die Körperachse des Tieres mit einer Bildfolgefrequenz von bis zu 25 Hz. Im Programm mussten die Feineinstellungen für diese Erfassung festgelegt werden. Nach Aufnahme der Testergebnisse ließen sich diese in Microsoft-Excel-Daten exportieren (Schwarz et al., 2002). Die aufgezeichneten Videosequenzen konnten im Avi-Format nach Divx-Kodierung gespeichert und bei Bedarf einer Reanalyse unterzogen werden, wenn die Filter-Kontrast-Methode mit den Standardeinstellungen keine ausreichend stabile Detektion gewährleistete. Eine Erweiterung der Funktionalität des Viewers sind die Plug-Ins, wobei in dieser Arbeit das Rearing- und Social-Interaction-Plug-In zur Erfassung des Aufricht- und sozialen Verhaltens zum Einsatz kamen.

Die Reanalyse der Daten wurde bei Testmäusen durchgeführt, deren Detektion sich im Originaltest als nicht ausreichend zuverlässig erwies. Durch Veränderung der Parameter der Sensitivität, den optischen Filtern und der Korrektur der Streckenlänge konnte in der Reanalyse ein stabileres Ergebnis erzielt werden. Für die Reanalyse größerer Mengen an Videosequenzen und Daten wurde das Programm „Viewer Automation Tool“ benutzt (entwickelt von Robert Rottscholl, AG Experimentelle Neurologie, BMFZ Marburg).

2.23 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse und Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit Hilfe des Programms SPSS 19 der Firma Systat. Am Anfang der Analyse stand die Überprüfung der Daten auf eine Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstests. Für normalverteilte Daten folgte im Baseline-Test eine einfaktorielle Varianzanalyse (“one way measure analysis of variance” / one way ANOVA). Im Falle signifikanter Unterschiede wurden die Gruppen untereinander mit einer Post-Hoc-Analyse vergli-

chen. Nach Überprüfung auf Varianzgleichheit mit dem Levene-Test erfolgte für varianzgleiche Daten der „least significant difference test“ mit Bonferroni-Korrektur. Nicht-varianzgleiche Daten konnten mit dem Tamhane-T2-Test verglichen werden. Im Falle nicht-normalverteilter Daten wurde der Kruska-Wallis-Test zur Überprüfung statistisch signifikanter Unterschiede angewandt. Bei signifikanten Differenzen können die gleichen Post-Hoc-Vergleiche wie bei normalverteilten Daten durchgeführt werden. Die beiden Versuchsgruppen des sozialen Interaktionstests wurden mittels ungepaartem Student's-t-Test verglichen. Im Rahmen des Überlebens-tests wurde keine genauere statistische Auswertung durchgeführt.

Die Analyse des LPS-Expositionstests erfolgte durch eine mehrfaktorielle (Behandlung; Genotyp; Zeit) Varianzanalyse mit Messwiederholung auf einem Faktor (abhängige, messwiederholte Variable über die Zeit). Anschließend schloss sich ein zweifaktorieller (Genotyp; Behandlung) ANOVA-Vergleich der einzelnen Testtage an. Da SPSS bei Interaktionseffekten der unabhängigen Variablen keine Post-Hoc-Vergleiche ermöglicht, wurde eine „single effects analysis“ durchgeführt. Das bedeutet für diesen Versuch einen einfaktoriellen ANOVA-Vergleich der LPS-behandelten Gruppen auf Effekte des Genotyps mit anschließender Bonferroni-Post-Hoc-Analyse.

In der Analyse der statistischen Vergleichstests wurde der F- oder χ^2 -Wert mit der Anzahl der Freiheitsgrade angegeben. Hierbei bezeichnet die erste Zahl die Anzahl der Freiheitsgrade zwischen den Testgruppen und die zweite Zahl innerhalb aller Testsubjekte. Als Signifikanzniveau sind die p-Werte aufgeführt. Ein p-Wert von $<0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet und mit dem Symbol * gekennzeichnet. Weitere Markierungen mit ** zeigen p-Werte $<0,01$ an und Signifikanzniveaus $<0,001$ sind mit *** ausgewiesen. Ein p-Wert zwischen 0,05 und 0,1 wird als Trend oder marginal signifikant bezeichnet. Die Testzeitpunkte t_1 - t_3 entsprechen den Versuchen im Alter von 8, 12 und 16 Wochen. Neben den deskriptiven Tabellen sind die Mittelwerte der Versuchsgruppen in Säulendiagrammen oder im kombinierten Säulen- und Liniendiagramm aufgetragen.

Aufgrund von statistisch signifikanten Differenzen zwischen den vor Ort gezüchteten und von extern erworbenen Wildtyp-Mäusen wurden letztere aus der statistischen Auswertung der Gewichtsentwicklung, des Rotarod-Tests, des Offenfeldtests und des Forced-Swim-Tests im Baseline-Versuch ausgeschlossen. Als Kontrollgruppe wurden entsprechend nur die im BMFZ geborenen Wildtyp-Mäuse eingesetzt. Während des

Baseline-Tests starben insgesamt zwei Mäuse (Genotyp $\text{STAT1}^{\text{WT/WT}}$ und $\text{STAT1}^{\text{F77A/F77A}}$) und im Expositionstest starb ein Testtier (Genotyp $\text{STAT1}^{\text{F77A/F77A}}$), deren Verhaltensdaten nicht ausgewertet wurden. Das statistische Signifikanzniveau wurde beidseitig auf 5% festgelegt. Dies bedeutet, dass p-Werte $<0,05$ als statistisch signifikant angesehen wurden. Für die tabellarische und graphische Darstellung der Ergebnisse wurde das Programm Excel 2007 von Microsoft eingesetzt.

3. Ergebnisse

3.1 Detektion der STAT^{F77A}-Mutation mittels Restriktionsverdau

Der Nachweis der Substitutionsmutation an Position 77 im STAT1-Protein wurde mittels PCR-Amplifikation und Restriktionsverdau geführt. Bei Vorliegen des Genotyps STAT1^{F77A} entfiel eine Angriffsstelle für das Restriktionsenzym TSP 509I, wodurch anstatt vier lediglich drei Bruchstücke entstanden. Im Falle einer F77A-Homozygotie wurde das Amplifikat in Stücke von 4, 40 und 238 Basenpaaren geschnitten. Der STAT1-Wildtyp zeichnete sich durch vier Teile mit 4, 40, 114, 124 Basenpaaren aus. Zur Identifikation der Bruchstückgrößen wurde eine analytische Gelelektrophorese durchgeführt. Hierbei wanderten die Spaltprodukte entsprechend ihrer Größe im elektrischen Spannungsfeld. In der Analyse war das 4 bp Stück nicht zu erkennen und die beiden 114 und 124 bp-Stücke erschienen als eine unaufgetrennte Bande. In Abbildung 9 ist das gelelektrophoretische Ergebnis eines exemplarischen Restriktionsverdaus gezeigt.

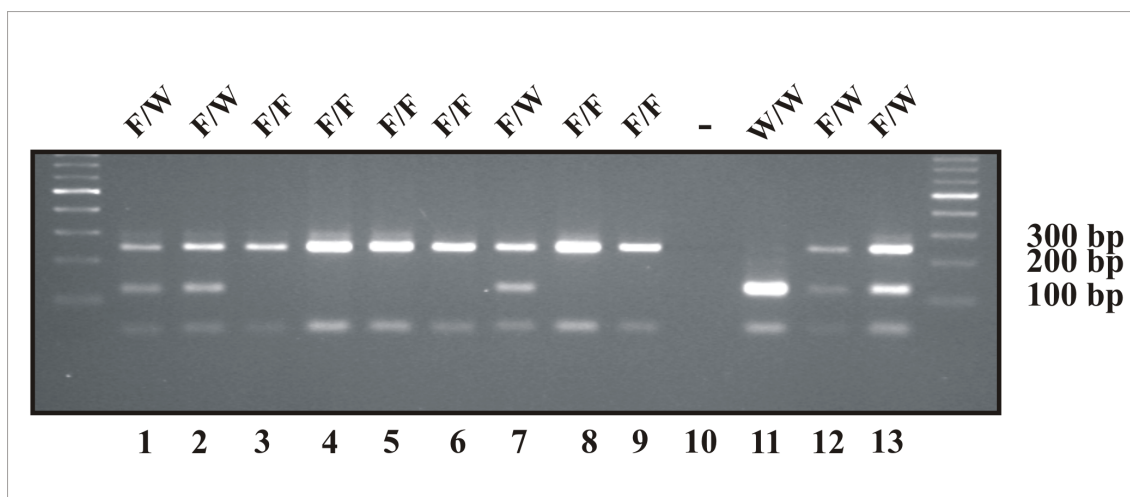


Abb. 9: Gelelektrophoretische Bestimmung des Genotyps von transgenen Mäusen. Dargestellt ist der gelelektrophoretische Auftrag von Verdauungsproben auf 13 Bahnen. Um die Bahnen sind die Referenzmarker des 100-bp Längenstandards aufgetragen. Hierbei zeigen die ersten drei Banden von unten den 100-, 200- und 300 bp-Standard. Bahn 11 zeigt die Banden einer Wildtyp-Maus (40-, 114-, 124 bp). In Bahn 1, 2, 7, 12, 13 sind die Fragmente des PCR-Produktes von heterozygoten Mäusen abgebildet (40-, 114-, 124-, 238 bp). Die Bahnen 3 bis 6 sowie 8 und 9 zeigen das Ergebnis von homozygoten STAT1^{F77A/F77A}-Mäusen (40-, 238 bp). Bahn 10 zeigt eine Kontrolle mit destilliertem Wasser.

3.2 Nachweis defizienter kooperativer DNA-Bindung von STAT1^{F77A}

Durch den Einsatz von radioaktiv-markierten Sonden mit einer doppelten GAS-Stelle (2xGAS) wurden mittels EMSA die Auswirkungen der Punktmutation STAT1^{F77A} auf kooperative DNA-Bindung untersucht. Nach Ablauf einer 45-minütigen Inkubationszeit

mit murinem Interferon- γ wurden aus kardialen Fibroblasten von Wildtyp- bzw. transgenen Mäusen Ganzzell-Extrakte hergestellt und Aliquots davon (4,5 μ l) mit der radioaktiv-markierten 2xGAS-Sonde in getrennten Ansätzen inkubiert. Ebenso wurden Ganzzell-Extrakte aus unstimulierten Fibroblasten mit der 2xGAS-Sonde inkubiert. Durch Zugabe eines 750-fachen molaren Überschusses an unmarkierten Oligonukleotiden wurde für nicht-kooperativ an radioaktiv-markierte DNA gebundene STAT1-Dimere eine verdrängende Konkurrenz geschaffen. Wie in Abb. 10A zu sehen ist, bilden sowohl die Wildtypvariante als auch die F77A-Mutante an der zweifachen GAS-Bindestelle dimere STAT1-DNA-Komplexe aus. Oberhalb dieser Banden fällt bei Wildtyp-STAT1 die Bildung von tetrameren Komplexen auf. STAT1^{F77A} ist durch den Substitutionsaustausch in der aminoterminalen Domäne nicht in der Lage, einer Konkurrenz widerstehende, stabile Tetramere auszubilden. Im Gegensatz dazu verschwinden die stabilisierten tetrameren STAT1-DNA-Komplexe von STAT1^{WT/WT} jedoch unter den Bedingungen der Konkurrenz nicht (Abb. 10A).

Mittels Reverser-Transkriptase-PCR konnte gezeigt werden, dass in Interferon- γ -Stimulation von STAT1^{WT/WT}-exprimierenden Fibroblasten, anders als im Falle der Punktmutante F77A, das murine *mig*-Gen effektiv induziert wird (Abb. 10B). Die Expression des Haushaltsgens *gapdh* war dagegen unabhängig vom Stimulationsstatus der Zellen und der Expression der jeweiligen STAT1-Variante. Dieses Ergebnis wurde als Hinweis auf eine dyfunktionale Interferon- γ -Aktivierbarkeit in Zellen der Knockin-Tiere gewertet.

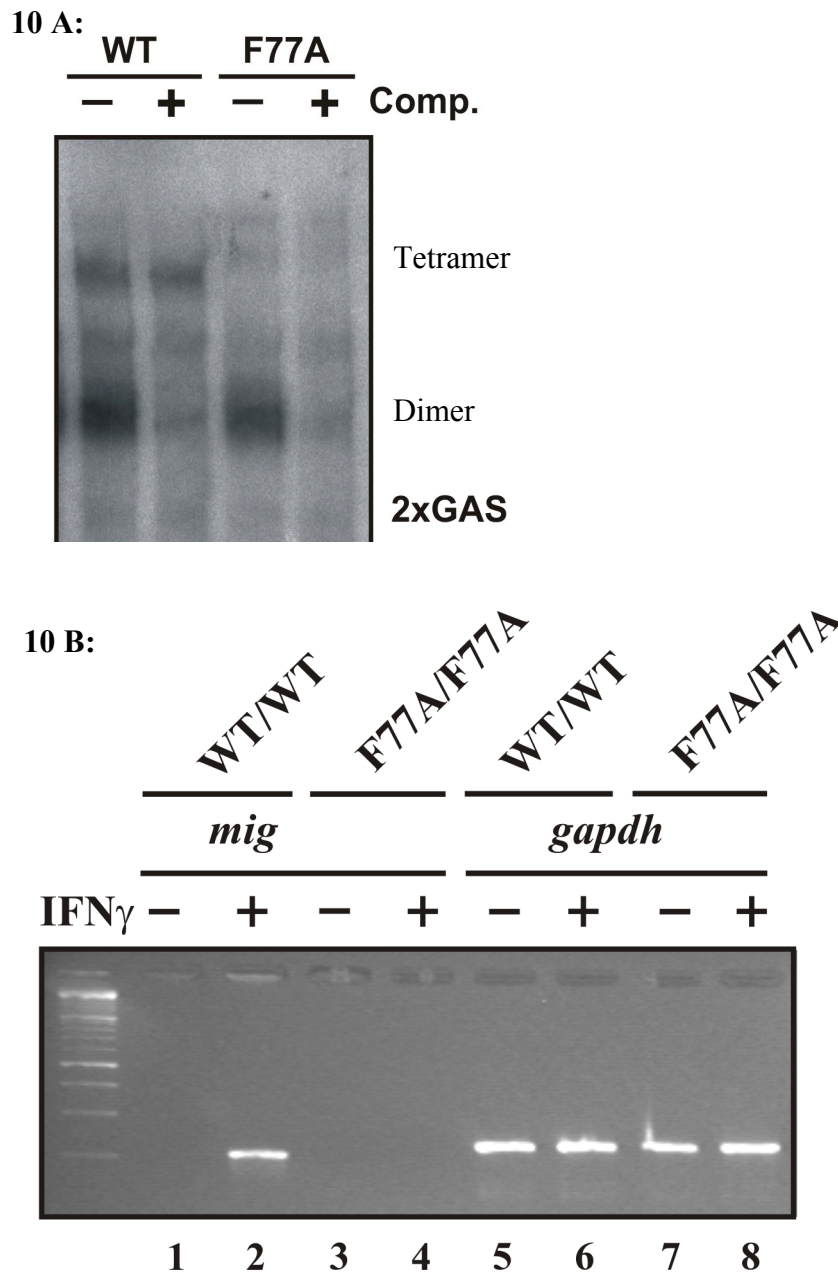


Abb. 10: STAT1^{F77A} weist Defekte in der Tetramerisierung auf DNA und der Aktivierbarkeit des *mig*-Gens auf. (A) Nachweis fehlender kooperativer DNA-Bindung des aminoterminal mutierten STAT1. Kardiale Fibroblasten aus STAT1^{WT/WT}- und STAT1^{F77A/F77A}-exprimierenden Mäuseherzen wurden unter Zellkulturbedingungen für 45 min mit 5 ng/ml Interferon- γ stimuliert. Die anschließend hergestellten Gesamtzellextrakte wurden für 15 min mit [³²P]-markierter 2xGAS-Sonde inkubiert. Nach der *In-vitro*-Inkubation wurde den Reaktionsansätzen ein 750-facher Überschuss an kalter M67-Sonde hinzugegeben. Gezeigt ist ein Autoradiogramm nach gelelektrophoretischer Auftrennung. Die obere Bande zeigt die DNA-stabilisierten tetrameren und die untere die dimeren STAT1-DNA-Komplexe vor und nach Kompetition. STAT1^{F77A/F77A}-Zellen sind nicht in der Lage, stabile Tetramere zu bilden. (B) Gelelektrophoretisches Ergebnis eines RT-PCR-Experimentes zum Nachweis der fehlenden Interferon- γ -Responsivität des *mig*-Gens in STAT1^{F77A/F77A}-exprimierenden Fibroblasten. Zellen wurden entweder unstimuliert oder für 45 min mit Interferon- γ stimuliert und nachfolgend die Induktion des *mig*- und als Kontrolle des *gapdh*-Gens bestimmt.

3.3. Gewichtsentwicklung der transgenen Versuchstiergruppen

Zur Überprüfung der organismischen Auswirkungen der Mutation $\text{STAT1}^{\text{F77A}}$ im Mausmodell wurde der Baseline-Test ohne Immunstimulation an gesunden Versuchstieren durchgeführt. Die angewandte Testbatterie umfasste die Gewichtsdocumentation, den motorischen und koordinativen Rotarod-Test, den angstassoziierten und lokomotorischen Offenfeldtest, den sozialen Interaktionstest sowie den depressionsassoziierten Forced-Swim-Test. Die folgenden Abschnitte zeigen die Resultate der Datenerhebung im Baseline-Test.

Zunächst wurde die altersabhängige Gewichtsentwicklung der Tiere untersucht. In der Testbatterie wurde das Körpergewicht jeweils vor dem Offenfeldversuch im Verhaltenslabor des BMFZ erhoben. Tabelle 9 weist die mittleren Gewichte der Testtiere mit Standardabweichung zu drei unterschiedlichen Messzeitpunkten (Woche 8, 12 und 16) aufgeteilt nach Genotyp aus.

Gewicht [g]	WT/WT (n=26)	F77A/WT (n=24)		F77A/F77A (n=25)	
Testzeitpunkt	M ± SD	M ± SD	p	M ± SD	p
1	25,0 ± 2,7	25,5 ± 2,3	1,000	25,4 ± 2,7	1,000
2	29,1 ± 3,6	30,7 ± 3,8	0,440	30,5 ± 4,1	0,562
3	32,2 ± 4,4	35,1 ± 4,2	0,100	34,2 ± 5,4	0,401

Tabelle 9: Die Gewichtsentwicklung der Versuchsgruppen im Baseline-Test. Gezeigt sind die Anzahl der Versuchstiere (n), die Mittelwerte und Standardabweichungen (M±SD) der Körpergewichte der Versuchstiere und das Signifikanzniveau der Statistik (p-Wert) zwischen $\text{STAT1}^{\text{WT/WT}}$ - und $\text{STAT1}^{\text{F77A/WT}}$ - sowie zwischen $\text{STAT1}^{\text{WT/WT}}$ - und $\text{STAT1}^{\text{F77A/F77A}}$ -Mäusen an allen drei Testzeitpunkten. Es waren keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen nachweisbar.

Gewichtsentwicklung

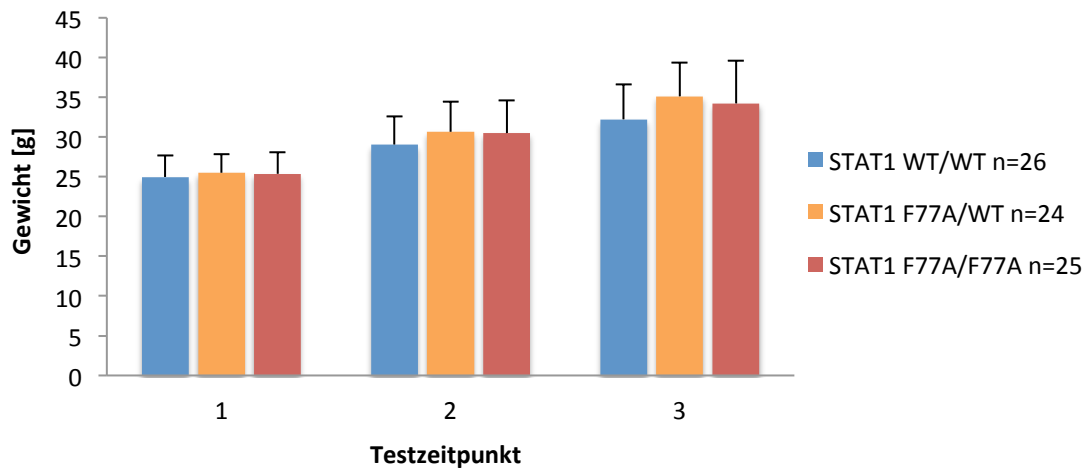


Abb. 11: Keine Unterschiede in der Gewichtsentwicklung im Baseline-Test. Gezeigt ist die graphische Darstellung der ermittelten Körpergewichte im Säulendiagramm über den dreimonatigen Testzeitraum. Die Mittelwerte sind nach Wildtyp-Gruppe (blaue Säule), heterozygoter Gruppe (orange Säule) und homozygot transgener Gruppe (rote Säule) unterteilt. Obwohl ein leicht geringerer Gewichtszuwachs der Kontrolltiere sichtbar ist, sind statistisch keine signifikanten Unterschiede zwischen den nach Genotyp getrennten Kohorten nachweisbar.

In Abbildung 11 ist das mittlere Gewicht der Testtiere zu den drei Messzeitpunkten, aufgeteilt nach Genotyp, dargestellt. Das Durchschnittsgewicht der Versuchsmäuse lag zu Testbeginn bei ca. 25 g und stieg im Alter von 16 Wochen auf ca. 34 g. In der zeitlichen Betrachtung fiel eine marginal langsamere Gewichtszunahme der Referenzgruppe auf. Ein signifikanter Unterschied konnte hierbei mithilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse ausgeschlossen werden (t_1 : $F_{2/72}=0,288$; $p=0,751$, t_2 : $F_{2/72}=1,327$; $p=0,272$ und t_3 : $F_{2/72}=2,496$; $p=0,090$). Lediglich im Alter von 16 Wochen lag ein Trend zwischen der Wildtyp- und der heterozygoten Gruppe vor. Zu diesem Zeitpunkt wiesen die heterozygoten Tiere ein statistisch marginal signifikant höheres Gewicht auf. Bei allen Genotypen war im Baseline-Test eine Gewichtszunahme über den Testzeitraum festzustellen. Insgesamt ergab die statistische Analyse keine signifikanten Differenzen im Körpergewicht zwischen den Versuchsgruppen.

3.4 Untersuchung motorischer Defizite der STAT1^{F77A}-Tiere

Im folgenden Abschnitt der Ergebnisdarstellung schließt sich die Auswertung der Daten des Rotarod-Tests an. Dieser Verhaltenstest kontrollierte motorische und koordinative Defizite der transgenen STAT1^{F77A}-Mauslinie. In diesem Experiment wurde die durchschnittliche Aufenthaltsdauer der Tiere auf der Stange pro Versuch sowie die Anzahl der Versuche und die kumulierte Aufenthaltsdauer bis zum Erreichen der Zielzeit von 120 s ausgewertet. Die Auswertung der durchschnittlichen Aufenthaltszeit der Versuchsgruppen auf der rotierenden Stange über die vier gewährten Versuche zu drei Messzeitpunkten ist in Tabelle 10 beschrieben.

Durchschnittszeit [s]	WT/WT (n=26)	F77A/WT (n=24)		F77A/F77A (n=25)	
Testzeitpunkt	M ± SD	M ± SD	p	M ± SD	p
1	26,4 ± 28,1	31,6 ± 33,2	1,000	32,3 ± 28,6	1,000
2	69,9 ± 37,2	87,1 ± 38,1	0,441	74,6 ± 47,9	1,000
3	106,2 ± 25,0	96,7 ± 32,2	0,934	90,9 ± 40,3	0,307

Tabelle 10: Aufenthaltsdauer im Rotarod-Test. Aufgezeigt ist die durchschnittliche Aufenthaltsdauer pro Versuch mit Standardabweichung (M±SD) und die p-Werte der multiplen statistischen Vergleichstests aufgeteilt nach Versuchsgruppen. Die Resultate der Vergleichstests erreichen kein Signifikanzniveau.

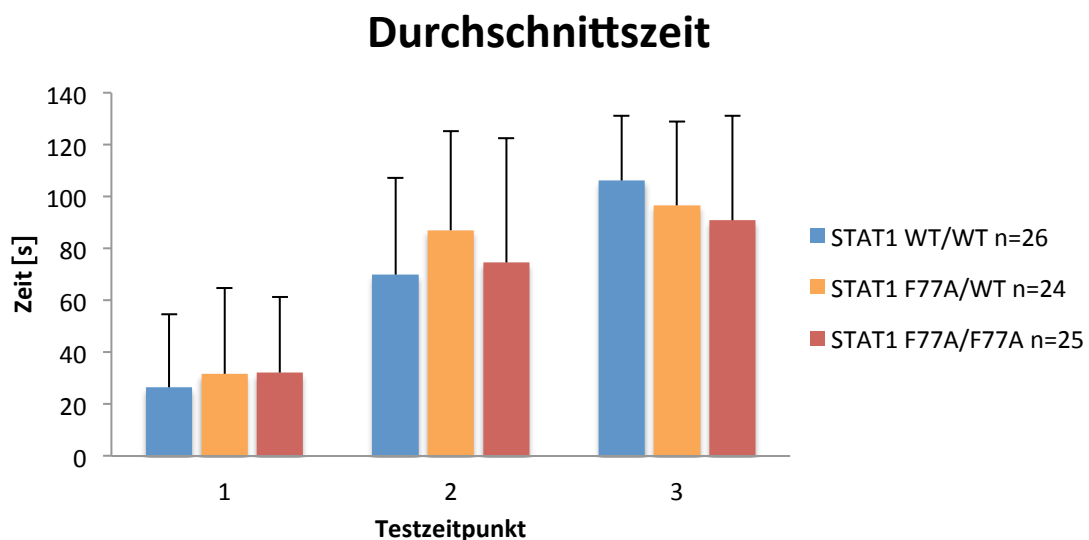


Abb. 12: Keine Differenzen in der Aufenthaltsdauer auf dem Rotarod. Dargestellt ist die mittlere Aufenthaltsdauer der Versuchstiere auf dem Rotarod im Alter von 8, 12 und 16 Wochen. Jedes Versuchstier erhielt 4 Versuche zum Erreichen des Zielwertes von 120 s. Die Testgruppen aus Wildtyp- (blau), heterozygoten- (orange) und homozygoten Mäusen (rot) verbrachten ähnliche Zeiten auf der rotierenden Stange.

Anhand von Abbildung 12 ist die Aufenthaltszeit pro Versuch der Testtiere auf dem Rotarod abzulesen. In der ersten Testung schafften die Mäuse es ungefähr 30 s lang, sich auf der Apparatur zu halten. Dieser Wert stieg während beiden weiteren Testungen auf ca. 95 s an. Der statistische Vergleich dieser Messgröße konnte an Zeitpunkt 1 und 2 bei normalverteilten Daten mittels einfaktorieller Varianzanalyse erfolgen, wohingegen am letzten Messpunkt die Daten bei signifikantem Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest durch einen Kruska-Wallis-Test verglichen wurden. Die statistische Auswertung zeigte zwischen den Wildtyp-, den heterozygoten sowie den homozygoten transgenen Tieren keine signifikanten Unterschiede zueinander (t_1 : $F_{2/72}=0,301$; $p=0,741$; t_2 : $F_{2/72}=1,137$; $p=0,326$; t_3 : $\chi^2_{2/72}=2,947$; $p=0,229$). Somit waren folglich auch die in Tabelle 10 angegebenen Resultate der multiplen Paarvergleiche nicht signifikant. Der Betrag der Standardabweichung ist in diesem Messparameter relativ groß, was vermutlich durch eine fehlende Habituation an die Testbedingungen zu erklären ist.

Weiterhin wurde die Versuchsanzahl bestimmt, die von den Testsubjekten benötigt wurde, um die Zielzeit von 120 s auf dem Rotarod zu erreichen. Da diese Daten nicht intervall-, sondern ordinalskaliert waren, wurden die mittleren Ränge der Versuchstiere zum statistischen Vergleich herangezogen. Die Ergebnisse des eingesetzten Kruska-Wallis-Tests sind in Tabelle 11 dargestellt.

Versuche bis zur Zielzeit	WT/WT (n=26)		F77A/WT (n=24)			F77A/F77A (n=25)		
	n_z	mR	n_z	mR	p	n_z	mR	p
1	5	9,3	9	12,2	n.s.	11	15,3	n.s.
2	17	29,1	21	27,7	n.s.	16	25,5	n.s.
3	24	33,0	22	34,2	n.s.	21	34,9	n.s.

Tabelle 11: Versuchsanzahl bis zur Zielzeit des Rotarod-Tests. Dargestellt sind die mittleren Ränge der Versuchstiere nach dem Kruska-Wallis-Test (mR) in der Testleistung Versuche bis zur Zielzeit unterteilt nach Genotyp ($STAT1^{WT/WT}$; $STAT1^{F77A/WT}$; $STAT1^{F77A/F77A}$). Zusätzlich sind die Gruppenstärke (n) und die Anzahl der Probanden, die zum jeweiligen Messzeitpunkt das Testziel erreichten (n_z) aufgetragen. Der Kruska-Wallis-Test erbrachte keine statistischen Unterschiede (n.s.=nicht signifikant) zwischen den Versuchsgruppen.

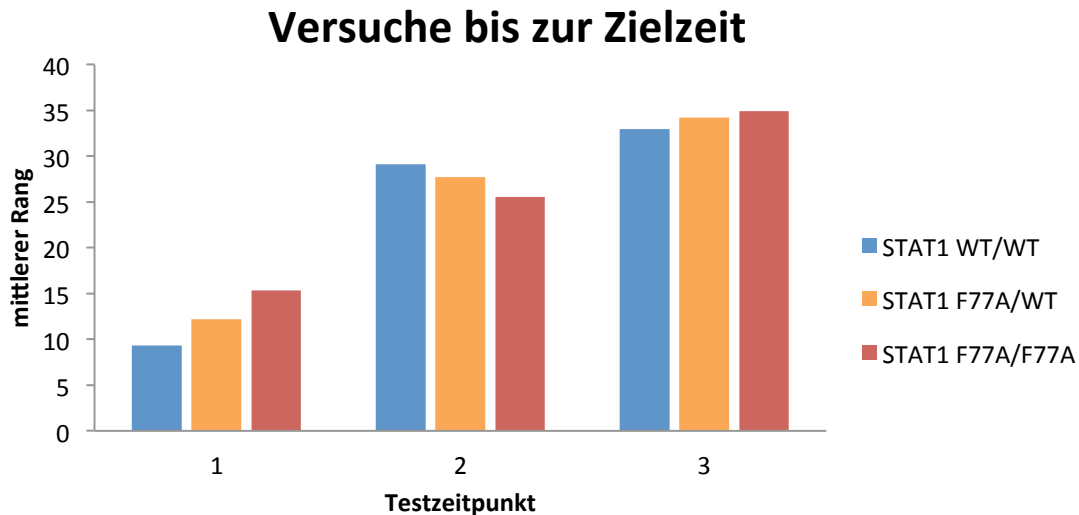


Abb. 13: Versuchsanzahl bis zum Erreichen der Zielzeit im Rotarod-Test. In der Graphik sind die mittleren Ränge nach dem Kruska-Wallis-Test unterteilt nach Genotyp dargestellt. Eine steigende Anzahl von Versuchstieren erreichte über den Testzeitraum jeweils den Zielwert, wobei sich die Gruppen nach der statistischen Auswertung dieses Parameters nicht unterschieden.

Abbildung 13 zeigt die mittleren Ränge der Versuchsmäuse in Abhängigkeit vom eingesetzten Genotyp. Die aufgetragene Rangfolge war das Resultat des Kruska-Wallis-Tests, der zum statistischen Vergleich der Versuchsgruppen in der Anzahl der Versuche bis zum Erreichen der Zielzeit von 120 s genutzt wurde. Die Auswertung ergab keinen signifikanten Effekt zwischen den Gruppen (t_1 : $\chi^2_{2/22}=1,555$; $p=0,460$; t_2 : $\chi^2_{2/51}=2,699$; $p=0,259$; t_3 : $\chi^2_{2/64}=1,501$; $p=0,472$). Im Vergleich der drei Testzeitpunkte fiel auf, dass jeweils eine größere Anzahl von Versuchstieren mutmaßlich aufgrund von Lerneffekten zu nachfolgenden Zeitpunkten die definierte Zielzeit erreichte.

Eine detaillierte Charakterisierung der Leistung im Rotarod-Test war durch die Beschreibung der beanspruchten Zeit zur Vollendung der Zielzeit von 120 s auf dem Rotarod möglich. Die Mittelwerte dieser Messgröße sind in Tabelle 12 beschrieben.

Zeit bis Zielwert [s]	WT/WT (n=26)			F77A/WT (n=24)			F77A/F77A (n=25)		
Testzeitpunkt	n _z	M ± SD		n _z	M ± SD	p	n _z	M ± SD	p
1	5	143,0 ± 24,3		9	166,0 ± 50,7	1,000	11	165,6 ± 42,72	1,000
2	17	147,5 ± 35,8		21	149,8 ± 39,6	n.s.	16	144,5 ± 36,25	n.s.
3	26	142,1 ± 43,1		22	146,9 ± 41,9	n.s.	21	139,3 ± 39,11	n.s.

Tabelle 12: Kumulierte Zeit bis zum Erreichen der Zielzeit im Rotarod-Test. Aufgezeigt ist die benötigte Zeit bis zum Zielwert (M) mit Standardabweichung (SD) sowie die Versuchsgruppenstärke (n) und die Signifikanzniveaus der multiplen Vergleichstest an t₁ (p). Durch die fehlende Signifikanz des Kruska-Wallis-Test wurden keine Post-Hoc-Tests an t₂ und t₃ durchgeführt. Die Anzahl n_z entspricht den Tieren, die den Zielwert zum jeweiligen Testzeitpunkt erreichten. Die statistischen Vergleichswerte weisen kein Signifikanzniveau auf (n.s.=nicht signifikant).

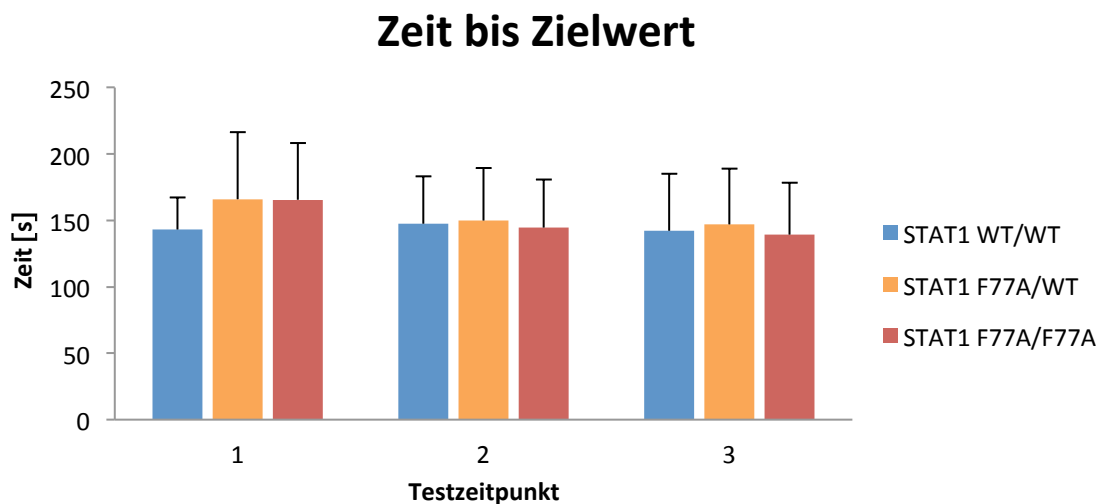


Abb. 14: Die Versuchsgruppen benötigen ähnliche Zeiten zum Erreichen des Zielwerts im Rotarod-Test. In der Graphik sind die kumulierten Zeiten bis zum Erreichen des Zielwerts der STAT1^{WT/WT}- (blau), STAT1^{F77A/WT}- (orange) und STAT1^{F77A/F77A}-Tiere (rot) über alle Messzeitpunkte dargestellt. Der statistische Vergleich zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen.

Die kumulierten Zeiten der Testgruppen bis zum Erreichen des Zielwertes sind in Abbildung 14 im Säulendiagramm abgebildet. Alle Testgruppen zeigten einen geringen Rückgang der Messzeiten über den Testverlauf. Da sich die Daten in ihrer Eigenschaft der Normalverteilung unterschieden, wurde am ersten Zeitpunkt ein einfaktorieller ANOVA-Test und an den weiteren Messpunkten ein Kruska-Wallis-Test durchgeführt. Die statistische Analyse wies kein Leistungsdefizit der transgenen Testgruppen im Vergleich mit der Wildtyp-Kontrollgruppe nach (t₁: F_{2/24}=0,555; p=0,582; t₂: $\chi^2_{2/54}$ =0,224; p=0,893; t₃: $\chi^2_{2/67}$ =0,079; p=0,961). Im Falle des Erreichens des Zielwertes benötigten alle Versuchsgruppen für die Testleistung ähnliche Zeiten.

Grundsätzlich konnte während des Testablaufs des Rotarod-Tests beobachtet werden, dass die Versuchstiere aller Genotypen häufig die Testumgebung aus Neugierde explorierten. Insgesamt ließen sich in der durchschnittlichen Aufenthaltsszeit auf dem Rotarod sowie der Anzahl und der Dauer bis zum Erreichen der Zielzeit von 120 s also keine Differenzen zwischen den getesteten Genotypen feststellen.

3.5. Charakterisierung der Mauslinie STAT1^{F77A/F77A} im Offenfeldtest

Zur Überprüfung von motorischen und emotionalen Veränderungen der STAT1-Variante wurde der Offenfeldtest in die Testbatterie integriert. Dieser vielseitige Versuch kann Aussagen über die Lokomotion, das Explorationsverhalten, die Ängstlichkeit und die Habituation eines Testtieres liefern. Im Rahmen des Offenfeldtests wurden über die gesamte 30-minütige Testdauer die Parameter zurückgelegte Distanz, Aktivität, Beschleunigungen, Rearing-Anzahl sowie Rearing-Dauer ausgewertet. In der angstassoziierten Analyse kamen zusätzlich die Messgrößen zurückgelegte Distanz und Aktivität in den ersten 5 Minuten sowie die Eintrittsfrequenzen in die äußere Zone (75% der Gesamtfläche) und innere Zone (25% der Gesamtfläche) zur Auswertung. Ferner wurden die verbrachte Zeit und die zurückgelegte Strecke in der inneren Zone in die Beurteilung des Offenfeldtests eingeschlossen. Alle Daten des Offenfeldtests entsprachen nach dem Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest einer Normalverteilung und wurden mithilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse ausgewertet.

Insgesamt 75 Testmäuse wurden im Alter von 8, 12 und 16 Wochen über 30 Minuten im Offenfeldtest beobachtet. In Tabelle 13 ist die Anzahl der Tiere in den jeweiligen Testgruppen sowie die mittleren zurückgelegten Gesamtdistanzen über die gesamte 30-minütige Testdauer mit Standardabweichungen zu den drei Messzeitpunkten beschrieben.

Distanz über 30 min [cm]	WT/WT (n=26)	F77A/WT (n=24)	F77A/F77A (n=25)		
Testzeitpunkt	M ± SD	M ± SD	p	M ± SD	p
1	8373,6 ± 2122,6	8543,0 ± 2747,7	1,000	8177,4 ± 2859,1	1,000
2	7172,1 ± 1910,0	7416,6 ± 2422,1	1,000	7129,1 ± 2173,4	1,000
3	5414,6 ± 2044,7	5191,3 ± 1575,5	1,000	5340,8 ± 2144,1	1,000

Tabelle 13: Zurückgelegte Distanzen im Baseline-Test. Gezeigt sind die mittleren zurückgelegten Distanzen [cm] aller Messzeitpunkte (M) mit Standardabweichung (SD) und die p-Werte der Post-Hoc-Tests im Vergleich der transgenen Gruppen zu der Referenzgruppe. Letztere weisen keine statistisch signifikanten Unterschiede in den zurückgelegten Entfernungen nach.

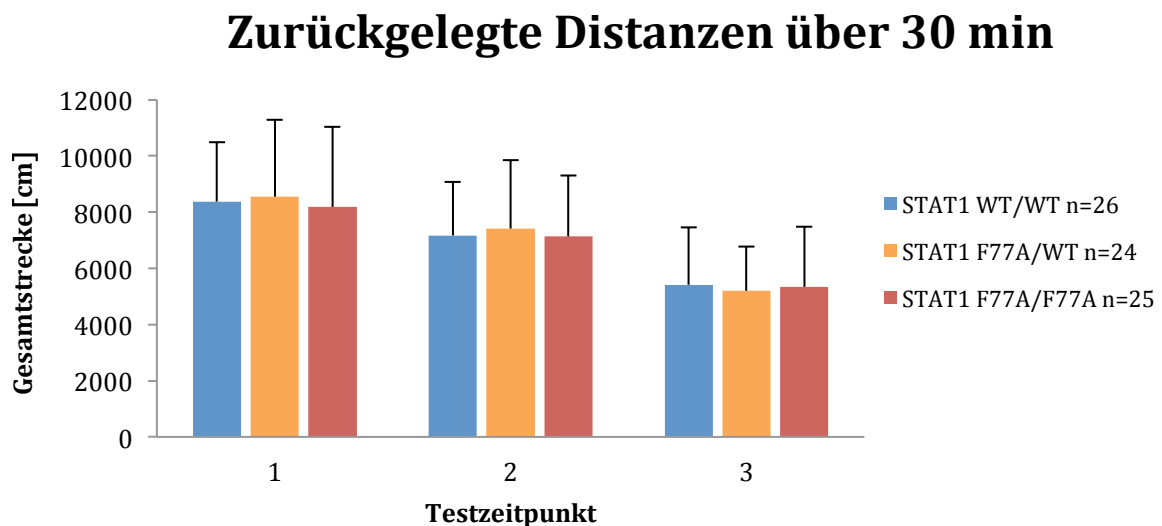


Abb. 15: Der Tetramerisierungsdefekt von STAT1 beeinflusst nicht die zurückgelegten Distanzen der Testtiere im Offenfeldtest. Getestet wurden 26 Wildtyp-Tiere (blau), 24 heterozygote (orange) und 25 homozygote Tiere (rot) im Offenfeld über die gesamte 30-minütige Testdauer im Alter von 8, 12 und 16 Wochen. Die statistischen Resultate zeigen keine signifikanten Differenzen in der zurückgelegten Entfernung zwischen den Testgruppen.

Aus Abbildung 15 ist ein Rückgang der Gesamtdistanzen von ca. 8000 cm im Alter von 8 Wochen auf Werte um 5000 cm bei dreifacher Testexposition ersichtlich. Die Überprüfung der Distanzen der drei Testgruppen auf statistische Unterschiede durch eine einfaktorielle Varianzanalyse zeigte keinen Effekt des Genotyps (t_1 : $F_{2/72}=0,122$; $p=0,885$. t_2 : $F_{2/72}=0,085$; $p=0,919$; t_3 : $F_{2/72}=0,444$; $p=0,643$). Dies bedeutet, dass die transgenen Gruppen ähnliche Gesamtdistanzen wie die Referenztiere im Offenfeldtest zurücklegten.

Im nächsten Schritt wurde das Aktivitätsniveau der Testgruppen im Offenfeld untersucht. In Tabelle 14 ist die durchschnittliche prozentuale Aktivität (Bewegungs-

geschwindigkeit > 2cm/s) der Testmäuse mit Standardabweichung während der gesamten 30-minütigen Testdauer gezeigt.

Aktivität [%]	WT/WT (n=26)	F77A/WT (n=24)		F77A/F77A (n=25)	
Testzeitpunkt	M ± SD	M ± SD	p	M ± SD	p
1	28,3 ± 5,9	27,6 ± 6,5	1,000	28,2 ± 9,1	1,000
2	18,2 ± 7,3	18,3 ± 6,0	1,000	17,1 ± 5,3	1,000
3	18,8 ± 9,5	18,6 ± 7,7	1,000	17,6 ± 7,6	1,000

Tabelle 14: Prozentuale Aktivität der Versuchsgruppen im Offenfeld. Dargestellt sind die Größe der Testgruppen (n), der Aktivitätsanteil (M) mit Standardabweichung (SD) und der p-Wert der Vergleichstests (p). Die p-Werte erreichen kein Signifikanzniveau.

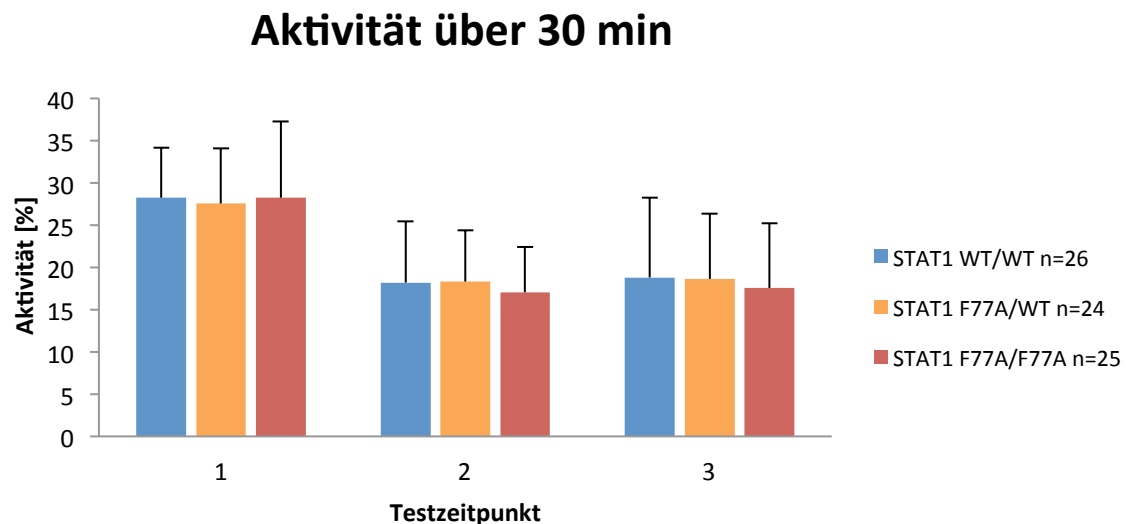


Abb. 16: Keine Beeinflussung der Aktivität im Offenfeld durch die Mutation STAT1^{F77A}. Es wurden 26 Wildtyp (blau), 24 heterozygote (orange) und 25 homozygote (rot) Mäuse über 30 Minuten im Alter von 8, 12 und 16 Wochen getestet. In der graphischen Abbildung ist der prozentuale Anteil des aktiven Verhaltens (Bewegungsgeschwindigkeit über 2 cm/s) mit Standardabweichung als Säulendiagramm aufgetragen. Die Versuchsgruppen zeigen nach den Vergleichstests ähnliche Aktivitätsniveaus.

Aus Abbildung 16 ist ersichtlich, dass die prozentuale Aktivität der Testgruppe am ersten Testzeitpunkt ungefähr 28% betrug und anschließend auf konstante Wert um ca. 18% an den nächsten Messpunkten abfiel. Der einfaktorielle ANOVA-Vergleich zur Überprüfung eines Genotyp-Effekts auf die Aktivität als prozentualer Anteil der Bewegungen des Tieres im Offenfeld zeigte keine signifikanten Differenzen (t_1 : $F_{2/72}=0,073$; $p=0,930$; t_2 : $F_{2/72}=0,301$; $p=0,741$; t_3 : $F_{2/72}=0,164$; $p=0,849$). Zwischen den ersten beiden Testzeitpunkten fällt die Aktivität der Gruppen ab und bleibt zum letzten Messpunkt hin konstant, sodass bereits bei der zweiten Exposition kein Habituations-

effekt mehr aus den Ergebnissen ersichtlich war (Abb. 16). Diese Daten ließen die Schlussfolgerung zu, dass die Versuchsgruppen sich in der prozentualen Aktivität im Offenfeld nicht unterschieden.

Im Folgenden wurde der Einfluss der unterschiedlichen Genotypen auf die Beschleunigungsfrequenz im Offenfeldtest geprüft. Tabelle 15 zeigt die deskriptiven Daten im Vergleich zwischen den einzelnen Gruppen. Eine Beschleunigung des Tieres im Offenfeldtests wurde als Geschwindigkeitsunterschied von >4 cm/s definiert.

Beschleunigungen	WT/WT (n=26)	F77A/WT (n=24)	F77A/F77A (n=25)
Testzeitpunkt	M \pm SD	M \pm SD	p
1	1013,0 \pm 200,9	1098,5 \pm 258,3	0,769
2	676,9 \pm 255,6	820,1 \pm 329,7	0,415
3	639,7 \pm 250,6	780,2 \pm 417,3	0,512

Tabelle 15: Beschleunigungsanzahl im Offenfeld. Drei Testgruppen (STAT1^{WT/WT}; STAT1^{F77A/WT}; STAT1^{F77A/F77A}) wurden im 30-minütigen Offenfeldtest beobachtet. Die Tabelle zeigt die Größe der Testgruppen (n), die mittleren Beschleunigungshäufigkeiten (M) mit Standardabweichung (SD) und das Signifikanzniveau der Post-Hoc-Vergleichstests (p). Die p-Werte liegen oberhalb des Signifikanzniveaus von 0,05.

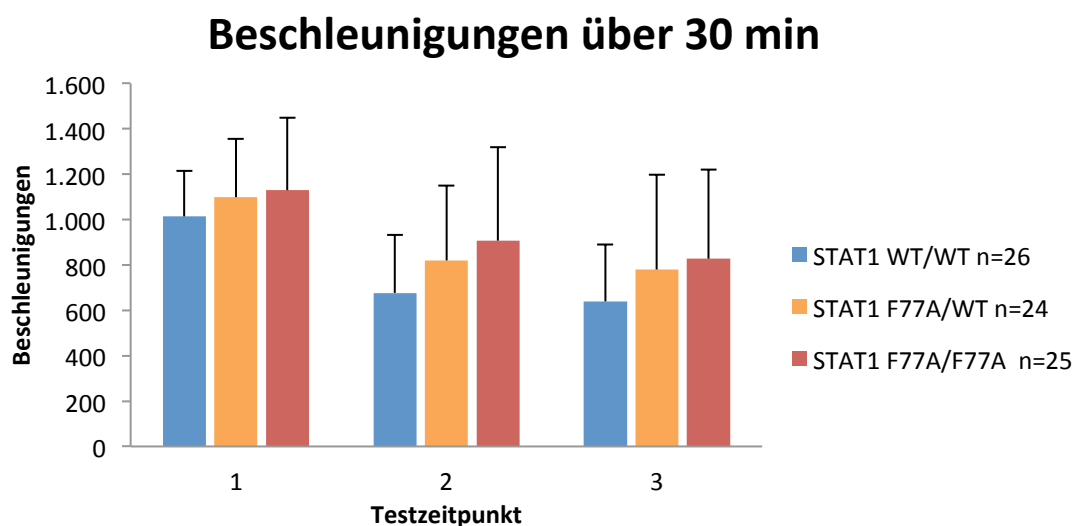


Abb. 17: Das Beschleunigungsverhalten im Offenfeld unterscheidet sich nicht zwischen den Versuchsgruppen. Die Abbildung zeigt die Anzahl der Beschleunigungen mit Standardabweichung über die gesamte Testzeit unterteilt nach Versuchsgruppen (STAT1^{WT/WT}; STAT1^{F77A/WT}; STAT1^{F77A/F77A}). Die statistische Auswertung wies keinen Effekt des Genotyps auf das Beschleunigungsverhalten nach.

Die Betrachtung der in Abbildung 17 dargestellten Beschleunigungen weist anschaulich einen gleichbleibenden Unterschied zwischen den Gruppen auf. Allerdings erlaubte die

statistische Analyse dieses Parameters kein Ablehnen der Nullhypothese. Die einfaktorielle ANOVA zeigte keine signifikanten Differenzen zwischen den Kontroll-, den heterozygoten und den homozygoten transgenen Tieren in der Variable Beschleunigungen zu allen Messzeitpunkten (t_1 : $F_{2/72}=1,325$; $p=0,272$. t_2 : $F_{2/72}=3,038$; $p=0,054$. t_3 : $F_{2/72}=1,898$; $p=0,157$). Allerdings lag zum Zeitpunkt t_2 eine marginale Signifikanz vor. Diese Unterschiede beruhten nach Tamhane-T2 Post-Hoc-Vergleich auf einer höheren Anzahl an Beschleunigungen der STAT1^{F77A/F77A}-Gruppe ($p=0,052$). Bei ähnlichen zurückgelegten Gesamtdistanzen und prozentualen Aktivitäten bestand ein statistischer Trend zu einem erhöhten Beschleunigungsverhalten der STAT1^{F77A}-Tiere. Ein statistisches Signifikanzniveau erreichte dieser Vergleich allerdings nicht.

Neben der horizontalen Aktivität spielt auch die vertikale Aktivität als lokomotions- und emotionalitätsassoziierter Parameter eine wichtige Rolle im Offenfeldtest. In Tabelle 16 ist die Anzahl der Rearings, das Aufstellen der Maus auf die Hinterpfoten im Sinne eines Aufrichtverhaltens, mit Standardabweichung über die gesamte Beobachtungszeit im Offenfeldtest aufgetragen.

Anzahl Rearings	WT/WT (n=26)	F77A/WT (n=24)		F77A/F77A (n=25)	
Testzeitpunkt	M ± SD	M ± SD	p	M ± SD	p
1	181,4 ± 67,4	180,2 ± 65,0	1,000	153,8 ± 88,0	0,564
2	154,7 ± 57,7	143,5 ± 67,8	1,000	126,6 ± 64,6	0,355
3	105,1 ± 74,8	112,1 ± 73,1	1,000	85,1 ± 50,9	0,874

Tabelle 16: Anzahl der Rearings im Offenfeldtest. Die Tabelle zeigt die deskriptive Darstellung der mittleren Rearing-Frequenz (M) im Offenfeld im Alter von 8, 12 und 16 Wochen mit Standardabweichung (SD). Zusätzlich sind die p-Werte als Ergebnis des statistischen Vergleichs der beiden transgenen Gruppen mit der Wildtyp-Gruppe abgebildet. Diese weisen keine statistische Signifikanz nach.

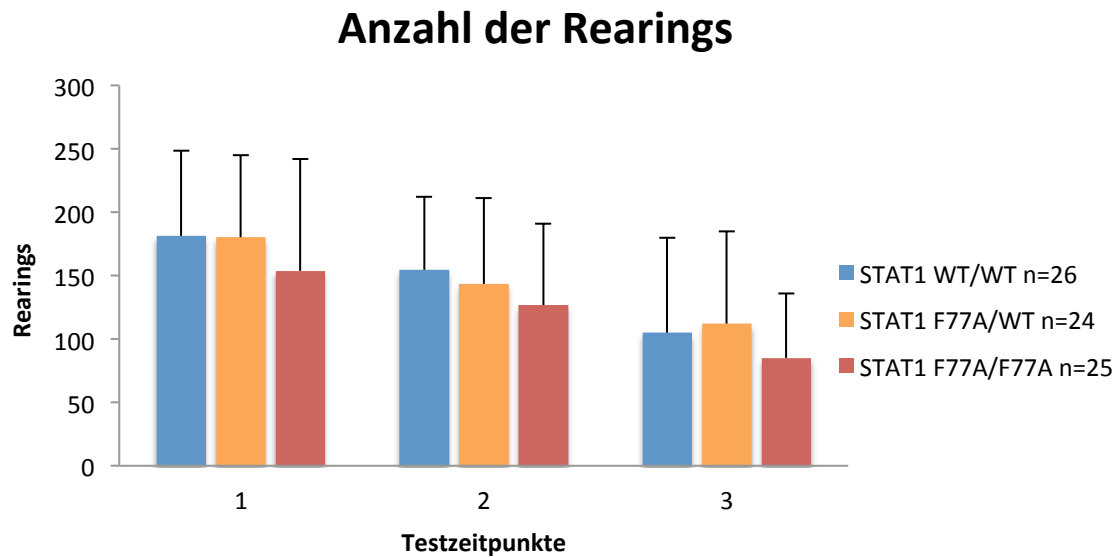


Abb. 18: Die Mutation STAT1^{F77A} verursachte keine Unterschiede im Aufrichtverhalten. Getestet wurden 75 Männchen mit drei unterschiedlichen Genotypen. Die Graphik zeigt im Säulendiagramm die Anzahl der vertikalen Aktivitäten aufgeteilt nach Wildtyp (blau), Heterozygot (orange) und Homozygot (rot). Das Verhalten in diesem Parameter unterscheidet sich nicht signifikant zwischen den Versuchsgruppen.

Aus Abbildung 18 ist ein gleichmäßiges Absinken der Rearing-Aktivität über den Testzeitraum ersichtlich. Hierbei zeigte die Gruppe der STAT1^{F77A/F77A}-Tiere stetig die geringste Aufrichtaktivität. Allerdings übte der Genotyp im statistischen Vergleich nach einfaktorieller Varianzanalyse keinen Einfluss auf das Aufrichtverhalten aus (t_1 : $F_{2/72}=1,109$; $p=0,336$; t_2 : $F_{2/72}=1,263$; $p=0,289$; t_3 : $F_{2/72}=1,074$; $p=0,347$), sodass nicht von einer Beeinflussung der Mutation STAT1^{F77A} auf die vertikale Aktivität ausgegangen werden konnte.

Neben der Rearing-Frequenz ermöglichte die Analyse der durchschnittlichen Dauer einer Aufrichtung im Offenfeldtest eine weitere Charakterisierung der vertikalen Aktivität. Tabelle 17 zeigt die Rearing-Dauer in Millisekunden unterschieden nach den Versuchsgruppen.

Rearing-Dauer [ms]	WT/WT (n=26)	F77A/WT (n=24)	F77A/F77A (n=25)		
Testzeitpunkt	M ± SD	M ± SD	p	M ± SD	p
1	539,5 ± 118,1	548,0 ± 73,5	0,986	553,8 ± 124,9	0,966
2	574,5 ± 126,0	608,3 ± 87,6	0,845	640,0 ± 111,7	0,111
3	596,8 ± 150,1	685,0 ± 136,4	0,097	716,8 ± 140,4	0,011

Tabelle 17: Mittlere Rearing-Dauer im Offenfeldtest. Gezeigt ist die Gruppenstärke (n), die mittlere Länge eines Rearings (M) mit Standardabweichung (SD) sowie die Resultate der multiplen Vergleichstest zwischen $\text{STAT1}^{\text{WT/WT}}$ und $\text{STAT1}^{\text{F77A/WT}}$ sowie $\text{STAT1}^{\text{WT/WT}}$ und $\text{STAT1}^{\text{F77A/F77A}}$. Der statistische Vergleich zeigt signifikant längere längere Aufrichtzeiten der $\text{STAT1}^{\text{F77A/F77A}}$ -Tiere im Alter von 16 Wochen (t_3).

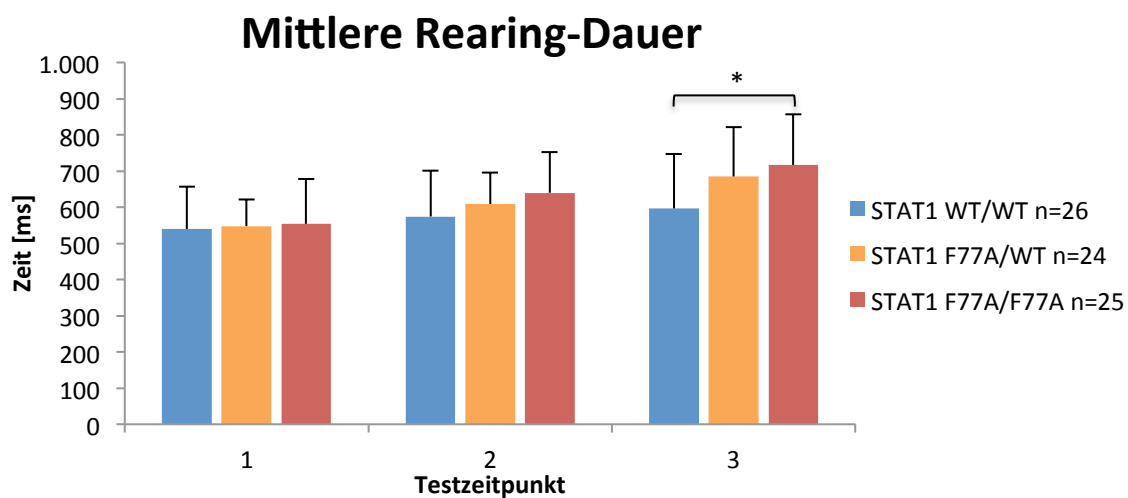


Abb. 19: Ein Tetramerisierungsdefizit von STAT1 bewirkt geringe Unterschiede in der mittleren Aufrichtdauer. Im Baseline-Test wurde das Verhalten von 75 Mäusen dreier Genotypen im Alter von 8, 12 und 16 Wochen erhoben. In der Graphik ist die durchschnittliche Länge eines Aufrichtvorgangs im Offenfeldtest als Säulendiagramm aufgetragen. Der statistische Vergleich der Versuchsgruppen zueinander ergibt signifikant längere Aufrichtungen der $\text{STAT1}^{\text{F77A/F77A}}$ -Mäuse am letzten Messzeitpunkt im Vergleich zur Referenzgruppe der Wildtyp-Tiere. Statistisch signifikante Abweichungen sind durch (*) gekennzeichnet.

Aus Abbildung 19 ist eine deutliche Divergenz der zeitlichen Dauer der Aufrichtaktivität über den Testzeitraum erkennbar. Zu allen drei Messzeitpunkten zeigten die $\text{STAT1}^{\text{F77A/F77A}}$ -Tiere ein verlängertes Aufrichtverhalten. Signifikante Unterschiede wies die ANOVA jedoch nur im Alter von 16 Wochen nach (t_1 : $F_{2/72}=0,112$; $p=0,895$; t_2 : $F_{2/72}=2,258$; $p=0,112$; t_3 : $F_{2/72}=4,858$; $p=0,010^*$). Der multiple Paarvergleich zeigte signifikante p-Werte und damit statistische Unterschiede zwischen den homozygot transgenen und den Wildtyp-Tieren ($p=0,011^*$). Die durchschnittliche Aufrichtlänge unterschied zu einem Testzeitpunkt als trennscharfer Parameter zwischen den Gruppen und wies als einzige Messgröße des Offenfeldtest signifikante Unterschiede nach. Bemerkenswert war außerdem, dass im Gegensatz zu den anderen

Parametern, wie auch der Rearing-Frequenz, die repetitive Testexposition keine sinkenden Rearing-Zeiten bewirkte. Insgesamt zeigte die Auswertung des Aufrichtverhaltens der STAT1^{F77A}-Tiere Tendenzen zu einem weniger aktiven Aufrichtverhalten, wobei die einzelnen durchgeführten Rearings zu einem Zeitpunkt verlängert waren. Zusammenfassend betrachtet beeinflusste der Genotyp das lokomotorische Verhalten der transgene STAT1^{F77A}-Tiere im Offenfeldtest nicht statistisch eindeutig. Lediglich ein Parameter wies zu einem Messzeitpunkt statistische Differenzen nach, wohingegen die restlichen Messgrößen keine Beeinflussung der motorischen Leistung durch die Mutation STAT1^{F77A} zeigten.

Bestimmte Variablen des Offenfeldtests sind für die Analyse von angstassoziiertem Verhalten gebräuchlich. Da die anfängliche Konfrontation mit der Testsituation einen potenten Angstausröser für die Versuchsmäuse darstellt, konnten die zurückgelegte Distanz und die prozentuale Aktivität im ersten fünfminütigen Testintervall zur Einschätzung des anxiogenen Verhaltens herangezogen werden (Gershenfeld und Paul, 1997; Kustova et al., 1998; Gould et al., 2007). Auch der innere Bereich des Testfeldes bedeutet für die Maus eine potentielle Bedrohung, sodass die Eintrittshäufigkeit in die äußere und innere Zone, die Distanz und Aufenthaltszeit in der inneren Zone in diesem Zusammenhang nützliche Parameter darstellen. Im ersten Schritt werden die Distanzen der Testgruppen im ersten 5-Minuten-Testintervall analysiert. Die deskriptive Beschreibung dieser Messgröße findet sich in Tabelle 18.

Distanz 5 min [cm]	WT/WT (n=26)	F77A/WT (n=24)		F77A/F77A (n=25)	
Testzeitpunkt	M ± SD	M ± SD	p	M ± SD	p
1	2294,2 ± 487,4	2045,1 ± 477,7	0,319	1945,8 ± 634,3	0,071
2	1450,5 ± 609,7	1353,1 ± 560,9	1,000	1128,6 ± 424,3	0,108
3	1231,8 ± 742,9	1095,8 ± 414,6	1,000	924,7 ± 508,8	0,184

Tabelle 18: Zurückgelegte Distanz innerhalb der ersten fünf Testminuten. Gezeigt ist die Gruppengröße (n), die durchschnittliche Strecke (M) im ersten Testintervall mit Standardabweichung sowie die p-Werte der Vergleichstest zwischen Kontrollgruppe (STAT1^{WT/WT}) und den transgenen Gruppen (STAT1^{F77A/WT} und STAT1^{F77A/F77A}). Im statistischen Vergleich sind keine signifikanten Differenzen der Testgruppen untereinander nachzuweisen. Die Resultate weisen lediglich auf einen Trend zwischen den Genotypen STAT1^{WT/WT} und STAT1^{F77A/F77A} am ersten Testzeitpunkt hin.

Zurückgelegte Distanz 5 min

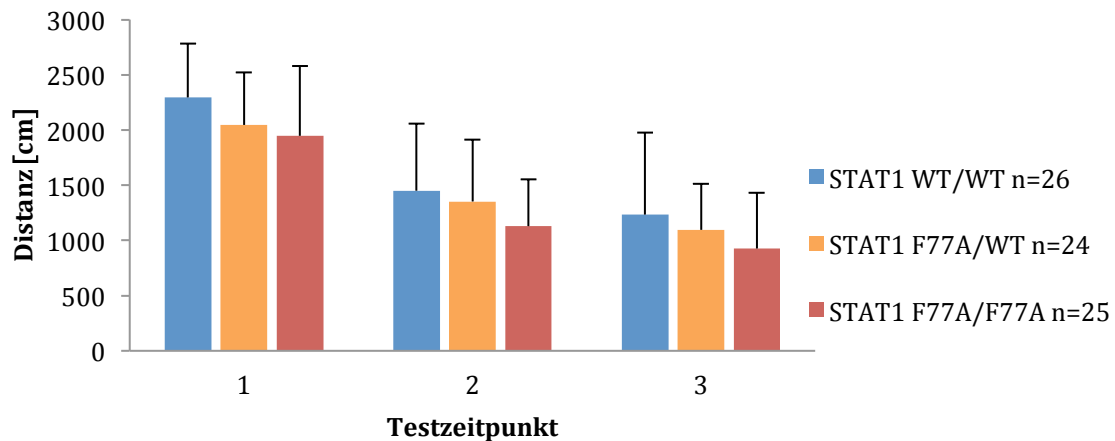


Abb. 20: Keine Differenzen in der initialen motorischen Antwort auf die Testexposition. Die Graphik stellt die zurückgelegte Distanz der Testtiere im Säulendiagramm aufgeteilt nach Genotypen (Wildtyp blau, heterozygot orange und homozygot rot) im ersten fünfminütigen Testintervall dar. Die insgesamt 75 Testmäuse wurden im Alter von 8, 12 und 16 Wochen im Offenfeld getestet. Trotz tendenzieller Unterschiede lassen sich keine statistischen Differenzen zwischen den Testgruppen nachweisen.

Da die initiale lokomotorische Antwort auf die Testexposition stark von der Emotionalität beeinflusst wird, kann dieser Parameter zur Überprüfung von genotypinduzierten Differenzen im Angstverhalten genutzt werden. In der Betrachtung der Gesamtwegstrecken in Abbildung 20 fielen, neben einem generellen Rückgang der Distanzen über die Testzeit, beständig kürzere Entfernungen der $\text{STAT1}^{\text{F77A/F77A}}$ -Gruppe auf. Im statistischen Vergleich durch eine einfaktorielle Varianzanalyse lagen jedoch zwischen den Kontroll- und den transgenen Tieren keine statistisch signifikanten Unterschiede vor (t_1 : $F_{2/72}=2,846$; $p=0,65$; t_2 : $F_{2/72}=2,838$; $p=0,10$; t_3 : $F_{2/72}=1,81$; $p=0,171$). Allerdings bestand zu Zeitpunkt t_2 eine marginale Signifikanz, die sich nach Bonferroni-korrigierter Post-Hoc-Analyse durch geringere zurückgelegte Distanzen der $\text{STAT1}^{\text{F77A/F77A}}$ -Gruppe erklärte ($p=0,071$). Ein eindeutiger Unterschied zwischen den Testgruppen in der frühzeitigen Fortbewegung ließ sich jedoch durch das fehlende Signifikanzniveau nicht annehmen.

Als zweiter Parameter der Bewegungsanalyse innerhalb des ersten Testintervalls wurde die Aktivität in der Offenfeldarena analysiert. Die Tabelle 19 zeigt die mittlere prozentuale Aktivität (Bewegungsgeschwindigkeit > 2 cm/s) innerhalb der initialen 5 Testminuten mit Standardabweichung.

Aktivität in den ersten 5 min [%]	WT/WT (n=26)	F77A/WT (n=24)		F77A/F77A (n=25)	
Testzeitpunkt	M ± SD	M ± SD	p	M ± SD	p
1	44,3 ± 6,3	39,4 ± 7,5	0,163	39,5 ± 11,5	0,161
2	27,3 ± 10,9	26,5 ± 10,6	1,000	21,5 ± 7,4	0,116
3	23,6 ± 12,1	22,2 ± 7,4	1,000	17,9 ± 9,4	0,133

Tabelle 19: Prozentuale Aktivität im ersten Zeitintervall. Getestet wurden 26 Wildtyp-, 24 heterozygote und 25 homozygote Mäuse im Alter von 8, 12 und 16 Wochen. Dargestellt ist der mittlere Anteil an aktivem Verhalten in Prozent (M) mit Standardabweichung (SD) innerhalb des ersten Testintervalls sowie die p-Werte der Post-Hoc-Vergleichstests. Nach den p-Werten waren keine statistischen Unterschiede zwischen den Genotypen nachweisbar.

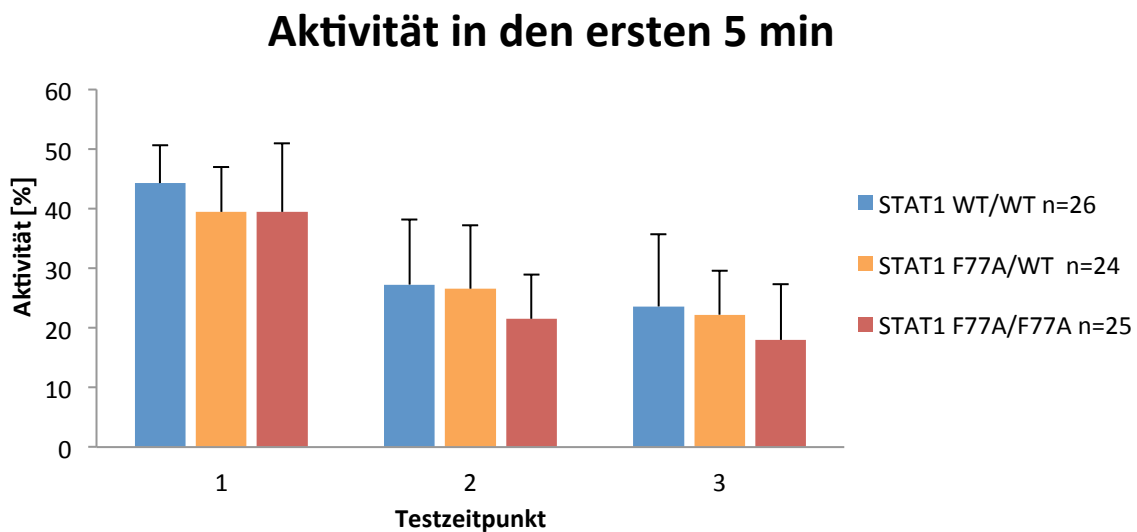


Abb. 21: Die prozentuale Aktivität der initialen Testphase unterscheidet sich nicht signifikant. Im Baseline-Test wurden insgesamt 75 Mäuse mit drei unterschiedlichen Genotypen zu drei Messzeitpunkten getestet. Im Säulendiagramm sind die prozentualen Aktivitäten der Kontroll- (blau), der heterozygoten (orange) und der homozygoten Gruppe (rot) dargestellt. Der initiale Offenfeldaktivität zeigt keine statistischen Differenzen zwischen den Gruppen.

Neben der Gesamtstrecke kann auch die Aktivität innerhalb der ersten fünf Testminuten zur Betrachtung der initialen Angstanwort herangezogen werden. Analog zu erster Messgröße unterschieden sich die Testgruppen nicht in ihrer Aktivität. In der graphischen Ansicht der Testzeitpunkte (vgl. Abbildung 21) fielen zwar konstant höhere Aktivitäten der Kontrollgruppe im Vergleich zu den transgenen Gruppen auf, der Genotyp übte allerdings nach einfaktorieller Varianzanalyse keinen statistisch signifikanten Effekt auf diesen Parameter aus (t_1 : $F_{2/72}=2,583$; $p=0,830$; t_2 : $F_{2/72}=2,595$; $p=0,820$; t_3 : $F_{2/72}=2,256$; $p=0,112$).

In einer Reihe von Studien stellte die Eintrittsfrequenz in den zentralen Bereich eines Offenfeldes die entscheidende Messgröße für die Einschätzung von angeständlichem Verhalten in Tierexperimenten dar (Kustova et al., 1998; Lacosta et al., 1999; Prut und Belzung, 2003; Dunn et al., 2005; Litteljohn et al., 2009; Litteljohn et al., 2010). In Tabelle 20 sind die mittleren Eintrittshäufigkeiten der Mäuse während der gesamten 30-minütigen Testzeit in die innere, zentrale Zone (25% der Gesamtfläche) dargestellt.

Eintritte innere Zone	WT/WT (n=26)	F77A/WT (n=24)		F77A/F77A (n=25)	
Testzeitpunkt	M ± SD	M ± SD	p	M ± SD	p
1	71,9 ± 19,8	63,8 ± 28,9	0,985	64,3 ± 36,4	1,000
2	51,9 ± 36,9	43,9 ± 21,0	1,000	40,6 ± 28,8	0,543
3	33,2 ± 27,7	32,0 ± 23,9	1,000	36,0 ± 29,0	1,000

Tabelle 20: Die Eintritte der Versuchsgruppen in die zentrale Zone. Dargestellt in der Tabelle sind die Gruppengröße der einzelnen Genotypen (n), die durchschnittliche Eintrittszahl in die innere Zone (M) mit Standardabweichung (SD) und die Ergebnisse der multiplen Vergleichstests (p). Letztere zeigen keine statistischen Unterschiede der Genotypen zueinander.

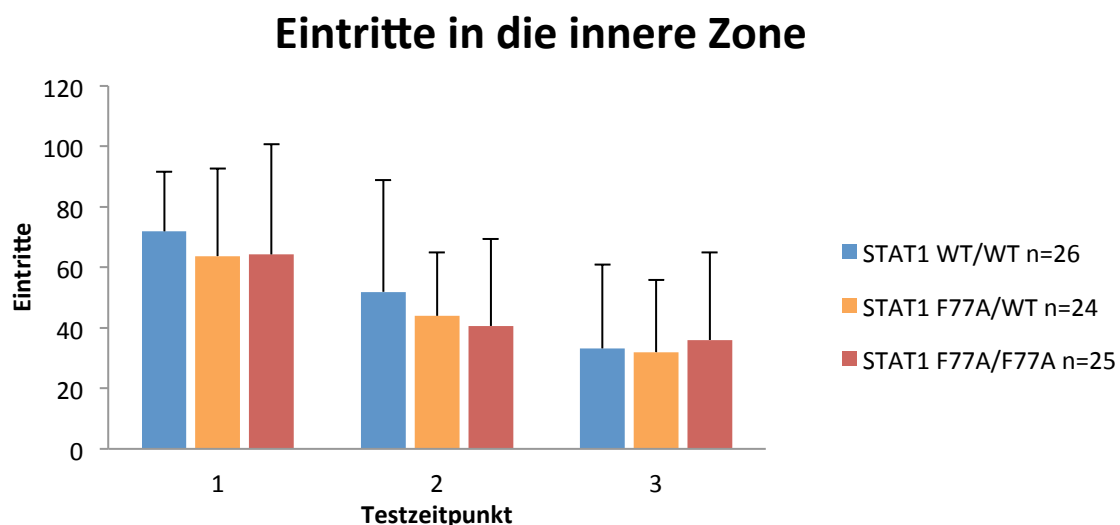


Abb. 22: Die Testgruppen zeigten ähnliches Eintrittsverhalten in das Zentrum der Testarena. Im Offenfeldtest wurden unbehandelte Versuchstiere dreier Genotypen über 30 Minuten beobachtet. Im Säulendiagramm ist die Episodenanzahl der Besuche der zentralen Zone der Wildtyp- (blau), heterozygoten (orange) und homozygoten Tiere dargestellt. Nach der statistischen Analyse unterscheiden sich die Gruppen in diesem Parameter nicht.

Nach statistischer Auswertung durch eine ANOVA lag keine Beeinflussung des Eintrittsverhaltens durch die Mutation $STAT1^{F77A}$ vor (t_1 : $F_{2/72}=0,618$; $p=0,542$; t_2 : $F_{2/72}=0,969$; $p=0,385$; t_3 : $F_{2/72}=0,142$; $p=0,868$). Alle Versuchsgruppen betraten die zentrale Zone in gleicher Frequenz.

Um die Eintrittsfrequenz in die zentrale Zone der Offenfeldarena bewerten zu können, musste außerdem die Episodenanzahl der Eintritte in die äußere Zone analysiert. Dies war notwendig, da aufgrund der Methodik des Offenfeldtests nicht von festen Startpunkten der Versuchstiere ausgegangen werden konnte. Die Tabelle 21 beschreibt die Anzahl der Eintritte in die äußere Zone der Arena (75% der Gesamtfläche).

Eintritte äußere Zone	WT/WT (n=26)		F77A/WT (n=24)		F77A/F77A (n=25)	
	M ± SD		M ± SD	p	M ± SD	p
Testzeitpunkt						
1	72,7 ± 19,7		64,5 ± 28,9	0,969	65,0 ± 36,2	1,000
2	52,7 ± 36,7		44,9 ± 21,0	1,000	51,4 ± 52,4	1,000
3	34,2 ± 12,1		32,9 ± 23,8	1,000	37,0 ± 29,0	1,000

Tabelle 21: Eintritte der Versuchsgruppen in die äußere Zone der Offenfeldarena. Aufgezeigt sind die Eintritte (M±SD) in die äußere Zone unterteilt nach Genotyp mit Gruppestärke (n) und Messzeitpunkt (8, 12 und 16 Wochen). Zusätzlich sind die p-Werte der Vergleichstest zwischen der Kontrollgruppe und den transgenen Gruppen angegeben, wobei keine statistischen Unterschiede feststellbar waren.

Eintritte in die äußere Zone

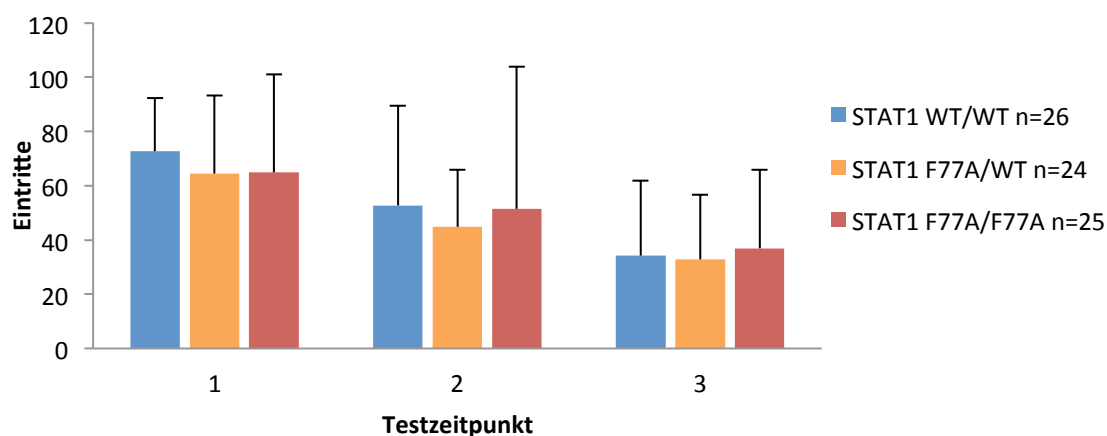


Abb. 23: Die Testgruppen betreten in gleicher Häufigkeit die äußere Zone. Das Säulendiagramm zeigt die Eintrittsfrequenz der Testgruppen (STAT1^{WT/WT} (n=26), STAT1^{F77A/WT} (n=24) und STAT1^{F77A/F77A} (n=25)) in die äußere Zone der Offenfeldarena über die gesamte Testdauer. Die Varianzanalyse weist vergleichbare Eintrittsfrequenzen zwischen den Gruppen auf.

Aufgrund eines uneinheitlichen Startpunkts der Testtiere musste zur präzisen Analyse des angstassoziierten Parameters der inneren Zone auch die Eintrittsfrequenz in die äußere Zone ausgewertet werden. Nach Abbildung 23 zeigte der graphische Vergleich einen ähnlichen Rückgang der Eintritte über die drei Messzeitpunkte. Der optische Eindruck konnte mittels Varianzanalyse auf einem Faktor (Genotyp) bestätigt werden.

Der gruppenunterscheidende Faktor löste keine signifikanten Differenzen aus (t_1 : $F_{2/72}=0,637$; $p=0,532$; t_2 : $F_{2/72}=0,285$; $p=0,753$; t_3 : $F_{2/72}=0,148$; $p=0,863$).

In Tabelle 22 ist als Maß für ein aktives Verhalten in der zentralen Zone die zurückgelegte Distanz innerhalb dieses Bereiches des Testfelds dargestellt.

Distanz in der inneren Zone [cm]	WT/WT (n=26)	F77A/WT (n=24)		F77A/F77A (n=25)	
Testzeitpunkt	M ± SD	M ± SD	p	M ± SD	p
1	149,3 ± 75,1	130,4 ± 54,5	1,000	128,7 ± 76,1	1,000
2	158,2 ± 128,6	142,8 ± 144,1	1,000	96,0 ± 73,5	0,779
3	78,0 ± 70,9	98,9 ± 90,0	1,000	74,7 ± 55,9	1,000

Tabelle 22: Zurückgelegte Distanz in der inneren Zone. Die Tabelle zeigt die Gruppenstärke der Versuchsgruppen (n), die mittleren Gesamtstrecken in der zentralen Arenazone mit Standardabweichung (M±SD) und die p-Werte der multiplen Vergleiche der Kontroll- und der transgenen Gruppen. Letztere weisen keine statistischen Unterschiede der Genotypen zueinander nach.

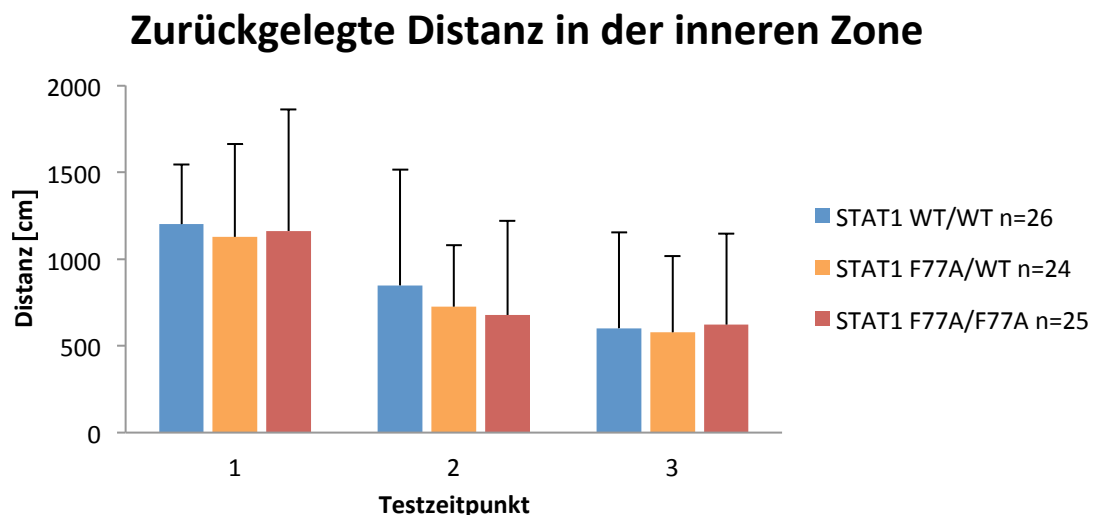


Abb. 24: Die Versuchsgruppen legen ähnliche Entfernungen in der zentralen Zone zurück. Die Gesamtstrecken im zentralen Testfeld in cm wurden an drei Zeitpunkten im Alter von 8, 12 und 16 Wochen über 30 Minuten bei den Testgruppen, bestehend aus 26 STAT1^{WT/WT}- (blau), 24 STAT1^{F77A/WT}- (orange) und 25 STAT1^{F77A/F77A}-Mäusen (rot), beobachtet. Die graphische Darstellung dieses Parameters unterteilt nach Testgruppen zeigt das Säulendiagramm. Nach dem einfaktoriellen Varianzvergleich unterscheiden sich die Gruppen nicht in der zentralen Wegstrecke.

Die in Abbildung 24 aufgetragenen Entfernungen in der zentralen Zone des Offenfeldes unterschieden sich nicht zwischen den drei unbehandelten Testgruppen. Diese Inter-

pretation ließen die nicht signifikanten Ergebnisse der einfaktoriellen Varianzanalyse zu (t_1 : $F_{2/72}=0,119$; $p=0,888$; t_2 : $F_{2/72}=0,668$; $p=0,506$; t_3 : $F_{2/72}=0,105$; $p=0,956$).

Zu den relevanten angstassoziierten Offenfeldparametern gehörte final die Besuchsdauer des inneren Offenfeldabschnitts, da kurze Aufenthaltszeiten im zentralen Testfeldbereich mit ängstlichem Verhalten assoziiert sind (Kustova et al., 1998). In Tabelle 23 ist die Aufenthaltsdauer der Testgruppen in Sekunden zu drei Testzeitpunkten sowie der statistische Vergleich zwischen den transgenen Gruppen und den Kontrolltieren beschrieben.

Aufenthaltszeit innere Zone [s]	WT/WT (n=26)	F77A/WT (n=24)		F77A/F77A (n=25)	
Testzeitpunkt	M ± SD	M ± SD	p	M ± SD	p
1	149,33 ± 75,12	130,40 ± 54,52	1,000	128,72 ± 76,10	0,881
2	158,18 ± 128,55	142,80 ± 144,09	1,000	96,00 ± 73,54	0,199
3	78,04 ± 70,85	98,88 ± 89,96	0,955	74,70 ± 55,91	1,000

Tabelle 23: Gleiche Aufenthaltsdauer im zentralen Bereich des Offenfelds. In der Tabelle sind sowohl die Gruppenstärke (n), als auch die mittlere Aufenthaltszeit im inneren Bereich des Offenfelds (M) mit Standardabweichung (SD) dargestellt. Zusätzlich zeigen die p-Werte die Ergebnisse des multiplen Paarvergleichs (p) zwischen den beiden transgenen Gruppen ($STAT1^{F77A/WT}$ und $STAT1^{F77A/F77A}$) und der Wildtyp-Gruppe ($STAT1^{WT/WT}$). Letztere erreichen kein Signifikanzlevel.

Aufenthaltsdauer in der inneren Zone

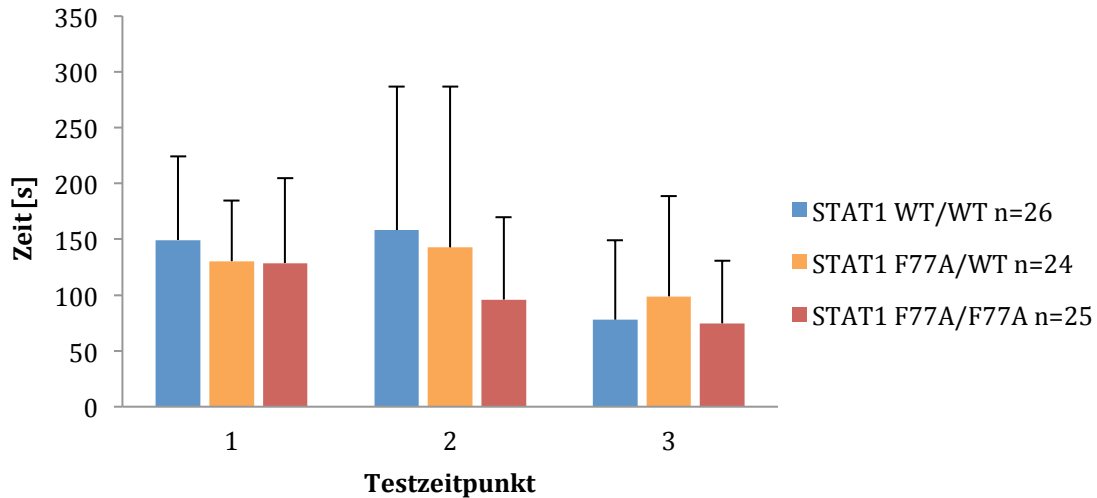


Abb. 25: Die Mutation STAT1^{F77A} besitzt keinen Effekt auf die Aufenthaltsdauer in der zentralen Zone der Offenfeldarena. Drei Testgruppen der Genotypen STAT1^{WT/WT}, STAT1^{F77A/WT} und STAT1^{F77A/F77A} wurden im Alter von 8, 12 und 16 Wochen über jeweils 30 Minuten im Offenfeld getestet. Der Parameter der Aufenthaltszeit in der inneren Zone des Testfeldes ist im Säulendiagramm dargestellt. An allen drei Messzeitpunkten verbrachten die Tiere ähnliche Zeitspannen im Arenazentrum.

Die Aufenthaltsdauer der Versuchsgruppen in der inneren Zone des Offenfelds (vgl. Abbildung 25) wurde nicht statistisch eindeutig durch den Genotyp beeinflusst. Bei normalverteilten Daten zeigte eine einfaktorielle Varianzanalyse keine signifikanten Unterschiede zu drei Messzeitpunkten (t_1 : $F_{2/72}=0,691$; $p=0,504$; t_2 : $F_{2/72}=1,870$; $p=0,162$; t_3 : $F_{2/72}=0,781$; $p=0,462$).

Insgesamt wurde durch die Betrachtung der zeitlichen Entwicklung der lokomotorischen Offenfeld-Messgrößen eine deutliche Abnahme der Aktivitäten der Versuchsmäuse nachgewiesen. Bis auf die durchschnittliche Rearing-Dauer zeigten alle Parameter diese Regressionstendenz. Die zahlreich erhobenen Variablen des Offenfeldtests wiesen gemeinhin keine signifikanten Unterschiede im Verhalten der Testgruppen zueinander auf. Weder in den lokomotorischen Parametern der Wegstrecken, Aktivitäten und Beschleunigungen noch im angeständlichen Verhalten innerhalb des ersten Testintervalls oder der zentralen Zone des Offenfelds ließen sich eindruckliche Differenzen feststellen. Als einzig signifikanter Unterschied zwischen den Testgruppen zeigten die STAT1^{F77A/F77A}-Mäuse verlängerte Aufrichtzeiten im Alter von 16 Wochen.

Bei einigen Parametern konnte eine konstante Rangfolge der Gruppenmittelwerte im zeitlichen Verlauf beschreiben werden. Das bedeutet, eine bestimmte Gruppe zeigte

konstant höhere Werte, obwohl keine statistisch signifikanten Gruppenunterschiede nachgewiesen wurden. Zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass trotz einiger Hinweise auf abweichende Verhaltensweisen die Mauslinie STAT1^{F77A} im Offenfeldtest keine statistisch entscheidenden Differenzen zeigte.

3.6 Messung der sozialen Interaktion von STAT1^{F77A}-Mäusen

Der soziale Interaktionstest wurde zur Kontrolle sozialer Verhaltensunterschiede sowie zur Untersuchung von angst- oder depressionsähnlichem sozialen Rückzugsverhalten der STAT1^{F77A}-Mäuse in die Testbatterie aufgenommen. Die Häufigkeiten und Gesamtdauer der Interaktionen über die 30-minütige Testzeit stellten die erhobenen Messgrößen dar. Dabei wurden jeweils die Kontakte einer Wildtyp-Maus mit einem heterozygoten STAT1^{F77A/WT}-Tier sowie eines Wildtyp-Tieres mit einer homozygoten STAT1^{F77A/F77A}-Maus gemessen. Die Art und Qualität (dominat, submissiv) der sozialen Kontakte ließ sich mit der genutzten Methode nicht erfassen.

Die Daten für die sozialen Interaktionen von C57Bl/6-STAT1-Wildtyp-Mäusen konnten der Publikation von Matsuo und Mitarbeitern (Matsuo et al., 2010) entnommen werden. Beim sozialen Interaktionstest wurden die hinzugekauften Tiere nicht aus der Analyse ausgeschlossen, da die Gruppen ansonsten große Unterschiede in der Probandenanzahl aufgewiesen hätten und die statistische Analyse keine signifikanten Differenzen in der sozialen Aktivität zwischen den Kontrolltieren ergab.

Aufgrund technischer Probleme mit dem „social-interaction plug-in“ des Viewers während der Testung der ersten Kohorte konnte bei diesen Tieren nur die zweite Hälfte des einstündigen Tests (30-60 Minute) des Tests aufgezeichnet und analysiert werden. Da die soziale Interaktion sich gewöhnlich konstant verhält, sind hieraus keine Abweichungen zu erwarten. Die Literaturdaten stammen von ca. 107 Tage alten Mäusen und ein Testdurchgang und -zeitpunkt ist beschrieben. Die Testlänge betrug 10 Minuten, sodass die Werte auf 30-minütige Testdauer extrapoliert wurden.

Da die motorischen Verhaltensdaten des sozialen Interaktionstests nicht verwendet werden konnten, verblieben als Variablen die Gesamtdauer und die Anzahl der sozialen Kontakte. Die deskriptiven Daten der Kontakthäufigkeiten sind in Tabelle 24 als Mittelwerte mit Standardabweichung und oberer- sowie unterer Konfidenzintervallgrenze abgebildet. Zur besseren Vergleichbarkeit der erhobenen Daten mit dem

Literaturwert sind letztere hier zusätzlich angegeben. Tabelle 25 zeigt die extrapolierten Literaturdaten von Matsuo et al., 2010.

Kontaktanzahl	F77A/WT - WT/WT			F77A/F77A - WT/WT			
Testzeitpunkt	M ± SD	KI UG	KI OG	M ± SD	KI UG	KI OG	p
1	104,3 ± 31,2	91,1	117,5	122,3 ± 23,9	112,9	132,9	0,028
2	99,5 ± 37,4	83,7	115,2	97,3 ± 22,6	87,9	106,6	0,805
3	72,9 ± 30,2	60,2	85,7	87,2 ± 35,6	72,6	101,9	0,136

Tabelle 24: Die Anzahl der Kontakte im sozialen Interaktionstest. Dargestellt sind die Mittelwerte (M), Standardabweichungen (SD), untere und obere Grenzen der Konfidenzintervalle (KI UG und KI OG) sowie die p-Werte des t-Test-Vergleichs zwischen den Paaren (p). Im Alter von 8 Wochen lagen signifikant mehr Interaktionen der Paare mit homozygot transgenen Mäusen vor.

Kontaktanzahl	WT/WT - WT/WT	
Testzeitpunkt	n	M
15 Wochen	630	174

Tabelle 25: Kontaktfrequenz von C57Bl/6-STAT1^{WT/WT}-Mäusen. Dargestellt ist die extrapolierte Kontaktanzahl (M) auf 30 Minuten Testzeit von 630 STAT1-Wildtyp C57/Bl6-Mäusen nach Matsuo und Mitarbeitern.

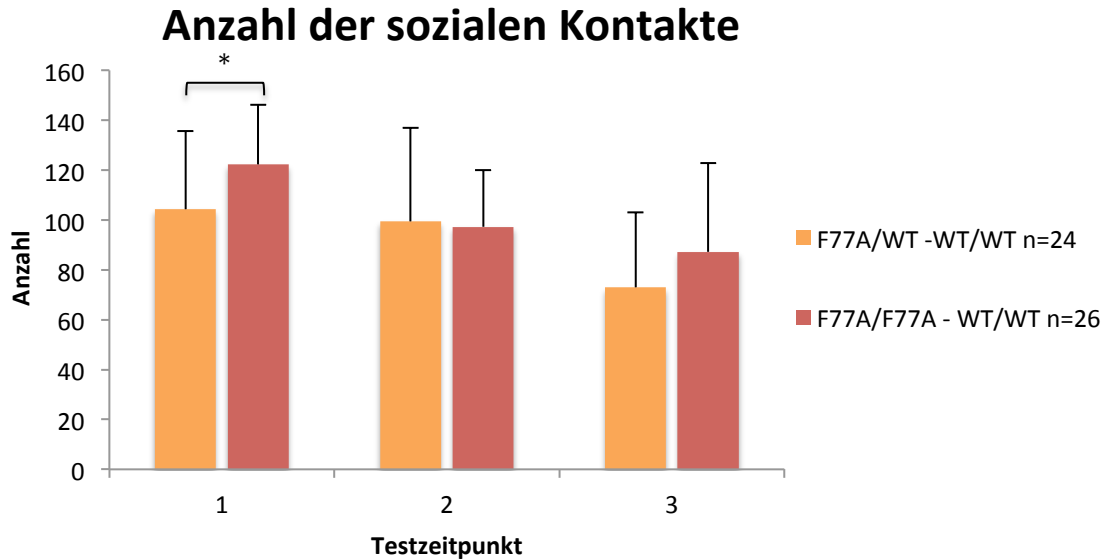


Abb. 26: Die Testpaare mit STAT1^{F77A/F77A}-Tieren zeigen eine erhöhte soziale Kontaktanzahl. Paare aus STAT1^{WT/WT} und STAT1^{F77A/WT} (orange) sowie Paare mit einem STAT1^{WT/WT}- und einem STAT1^{F77A/F77A}-Partner (rot) wurden im Alter von 8, 12 und 16 Wochen für 30 min im Offenfeld beobachtet und dabei ihre sozialen Interaktionen gemessen. Das Säulendiagramm zeigt die Interaktionsfrequenz im Vergleich der beiden Testgruppen. Die Gruppe mit einem homozygoten transgenen Partner zeigt im Alter von 8 Wochen signifikant häufiger Interaktionen.

Zum Vergleich der beiden Versuchsgruppen des sozialen Interaktionstests wurde der t-Test nach Student benutzt. Hierbei erbrachte der t-Test für ungepaarte Stichproben zum ersten Testzeitpunkt signifikante Differenzen der Testgruppen zueinander. Die Paare von Wildtyp- und homozygoten Mäusen ($122,3 \pm 23,9$) zeigten eine erhöhte soziale Kontaktfreudigkeit verglichen mit den Paaren aus heterozygoten- und Wildtyp-Tieren ($104,3 \pm 31,2$) (s. Abbildung 26). Zu den übrigen Messzeitpunkten übte der Genotyp keinen statistisch signifikanten Einfluss aus ($t_1: t_{43,0}=2,276; p=0,028^*$; $t_2: t_{37,6}=0,246; p=0,807$; $t_3: t_{47}=1,517; p=0,136$). Im Vergleich mit den Literaturwerten wiesen die getesteten Gruppen eine verminderte Anzahl an sozialen Kontakten pro 30-minütiger Testzeit auf. Der Literaturwert (174 Kontakte) lag oberhalb der Konfidenzintervalls beider Gruppen ($60,2-117,5$ und $72,6-132,9$) zu jedem Zeitpunkt.

Als weiterer Parameter des sozialen Interaktionstests ist die Gesamtdauer der sozialen Interaktionen in Tabelle 26 dargestellt.

Gesamtdauer der Kontakte [s]	F77A/WT - WT/WT (n=24)				F77A/F77A - WT/WT (n=26)				
	M	±	SD	KI UG	KI OG	M	±	SD	p-Wert
Testzeitpunkt									
1	451,5	±	201,5	366,4	536,6	512,9	±	159,1	0,236
2	449,9	±	188,2	370,4	529,3	411,9	±	130,1	0,414
3	415,4	±	242,3	313,1	517,7	393,3	±	192,1	0,742

Tabelle 26: Gesamtdauer der sozialen Kontakte. In der Tabelle sind die Kontaktdauer (M) mit Standardabweichung (SD), die obere und untere Grenze des Konfidenzintervalls (KI UG, KI OG) und die Gruppenstärke (n) an drei Testzeitpunkten dargestellt. Der durchgeführte t-Test ergab keine Unterschiede zwischen den Gruppen in diesem Parameter.

Gesamtdauer der Kontakte [s]	WT/WT - WT/WT	
Testzeitpunkt	n	M
15 Wochen	630	246

Tabelle 27: Gesamtdauer der sozialen Kontakte nach Matsuo et al., 2010. Die Tabelle zeigt die Gesamtzahl der Referenztiere (n) und die Mittelwerte (M) der quantifizierten sozialen Kontakte.

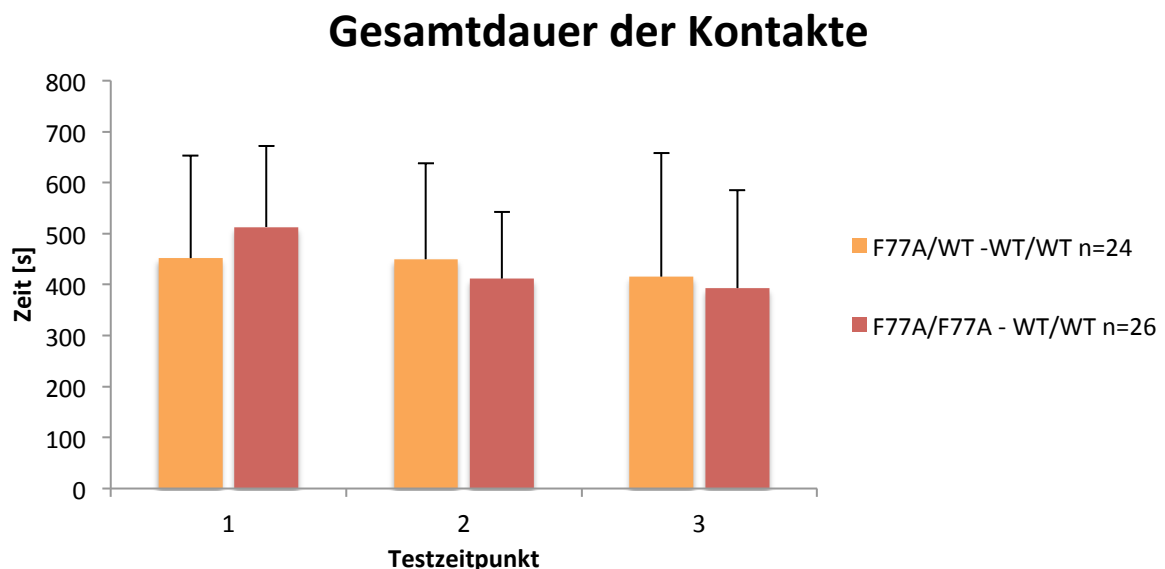


Abb. 27: Ein STAT1-Tetramerisierungsdefizit bewirkt keine Unterschiede in der Gesamtdauer der sozialen Kontakte. Getestet wurden 24 Paare aus von Wildtyp- und heterozygoten Tieren (orange) sowie Wildtyp- und homozygoten transgenen Tieren (rot). Dargestellt ist die mittlere Gesamtdauer der sozialen Kontakte im Säulendiagramm im Alter von 8, 12 und 16 Wochen.

Die Testgruppen unterschieden sich in der in Abbildung 27 gezeigten Gesamtdauer der sozialen Kontakte nicht, da der durchgeführte t-Test-Vergleich für ungepaarte Stichproben nicht signifikant ausfiel (t_1 : $t_{47}=1,201$; $p=0,236$; t_2 : $t_{47}=0,825$; $p=0,414$; t_3 : $t_{47}=0,355$; $p=0,724$). Die erhobenen Konfidentintervalle (313,1-536,6 s und 314,0-580,6 s) der transgenen Gruppen lagen zu allen Testzeitpunkten deutlich oberhalb des Literaturmittelwerts (246 s).

Bei einzelnen Paaren kam es während der Testung zu Rankämpfen und aggressivem Beissverhalten. Diese gingen generell jedoch nicht von Mäusen eines bestimmten Genotyps aus, sodass dies als normales Rangverhalten gedeutet wurde. Auch die Art des sozialen Kontakts schien sich nicht zwischen den Genotypen zu unterscheiden.

Zusammenfassend zeigte die Auswertung des SIT im Vergleich der transgenen Gruppen mit jeweils unbekannten Wildtyp-Testpartnern höhere Kontaktwerte des $STAT1^{F77A/F77A}$ -Paares am ersten Testzeitpunkt. Der Vergleich mit den Literaturdaten erbrachte eine niedrigere Kontaktanzahl und eine erhöhte Gesamtdauer der Kontakte der $STAT1^{F77A}$ -Paare im Vergleich zu reinen Wildtyp-Kontrollpaaren.

3.7 Depressionsähnliches Verhalten der Mauslinie $STAT1^{F77A/F77A}$ im Forced-Swim-Test

Als letzter und physisch anstrengendster Test innerhalb der Testbatterie wurde der Forced-Swim-Test durchgeführt. Seine Durchführung erfolgte zur Charakterisierung des depressionsähnlichen Verhaltens der untersuchten Mauslinie. Im sechsminütigen FST wurden die Verhaltensparameter Immobilität/Floating, Swimming und Struggling erhoben. Sowohl die Verhaltensdauer gemessen in Sekunden innerhalb der Gesamtzeit von 360 s als auch die Anzahl der Verhaltensänderungen (counts) wurden analysiert. Zusätzlich kamen die traditionelle Auswertung nach Porsolt, nämlich die Immobilität der letzten vier Testminuten (Porsolt et al., 1977a), und die getrennte Auswertung der beiden Testhälften zum Einsatz.

Als erste Messgröße des FST wurde das Floating ausgewertet. Porsolt definierte Floating als Verhalten bei dem die Tiere nur die Bewegungen durchführen, die notwendig sind, um sich gerade über der Wasseroberfläche zu halten (Porsolt et al., 1977a; Porsolt et al., 1977b). In Tabelle 28 ist die mittlere Floating- oder Immobilitätszeit der Tiere in

Sekunden während des gesamten sechsminütigen Tests mit Standardabweichung dargestellt.

Immobilitätszeit [s]	WT/WT (n=26)	F77A/WT (n=24)		F77A/F77A (n=25)	
Testzeitpunkt	M ± SD	M ± SD	p	M ± SD	p
1	236,9 ± 31,3	256,2 ± 33,2	0,080	264,0 ± 25,4	0,006
2	260,1 ± 41,0	276,7 ± 38,4	0,320	293,8 ± 26,9	0,004
3	279,8 ± 38,9	278,8 ± 31,3	1,000	274,8 ± 41,1	1,000

Tabelle 28: Die Floating- oder Immobilitätszeit im Forced-Swim-Test. Dargestellt sind die Immobilitätszeiten [s] im Forced-Swim-Test im Alter von 8, 12 und 16 Wochen unterteilt nach Wildtyp-Tiere ($STAT1^{WT/WT}$), heterozygoten ($STAT1^{F77A/WT}$) und homozygot transgenen Tieren ($STAT1^{F77A/F77A}$). Die Tabelle zeigt die Gruppengröße (n), die mittleren Floating-Zeiten mit Standardabweichung ($M \pm SD$) sowie die Resultate der multiplen Vergleichstests (p). Es bestehen signifikante längere Floating-Zeiten der $STAT1^{F77A/F77A}$ -Gruppe im Alter von 8 und 12 Wochen.

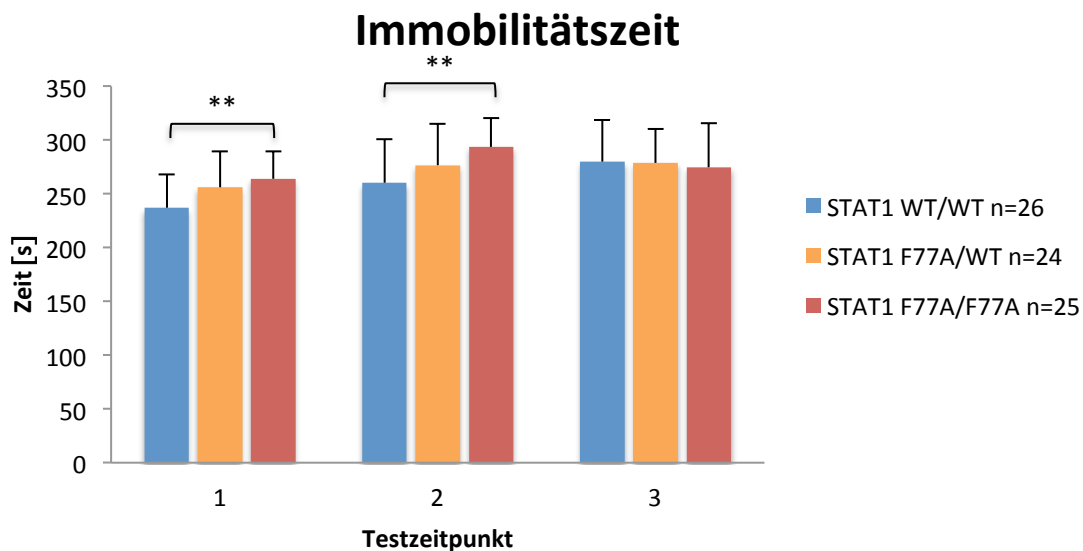


Abb. 28: Der Genotyp $STAT1^{F77A/F77A}$ verursacht eine verlängerte Immobilitätszeit im Forced-Swim-Test. Im Forced-Swim-Test wurden insgesamt 75 Mäuse im Alter von 8, 12, und 16 Wochen über sechs Minuten getestet. Das Säulendiagramm zeigt die Floating-Zeiten in Sekunden der einzelnen Testgruppen ($STAT1^{WT/WT}$ (blau), $STAT1^{F77A/WT}$ (orange) und $STAT1^{F77A/F77A}$ (rot)). Im Alter von 8 und 12 Wochen verbringt die homozygot transgene Gruppe signifikante längere Zeiten mit Floating-Verhalten. Signifikante Unterschiede sind mit einer Klammer und ** gekennzeichnet.

Wie Abbildung 28 zu entnehmen ist, zeigten die $STAT1^{F77A/F77A}$ -exprimierenden Versuchstiere längere Immobilitätszeiten im Alter von 8 und 12 Wochen. Zu Zeitpunkt 3 lagen alle Testgruppen auf einem Aktivitätsniveau. Der statistische Vergleich konnte bei normalverteilten Daten durch eine einfaktorielle ANOVA erfolgen, die zwischen

den Gruppen signifikante Unterschiede an den beiden ersten Messzeitpunkten erbrachte (t_1 : $F_{2/72}=5,486$; $p=0,006$; t_2 : $F_{2/72}=5,585$; $p=0,006$; t_3 : $F_{2/72}=0,125$; $p=0,883$). Paarweise Vergleiche zwischen den Gruppen nach Bonferroni-Korrektur ergaben für die $STAT1^{F77A/F77A}$ -Gruppe ($M=264,0$ s \pm 25,4 s; 11,4%) signifikant höhere Immobilitätszeiten gegenüber der Kontrollgruppe ($M=236,9$ s \pm 31,3 s) zu t_1 ($p=0,006^{**}$). Der Vergleich der heterozygoten Tiere mit der Kontrollgruppe erbrachte eine marginale Signifikanz im Sinne einer größeren Floating-Zeit der $STAT1^{F77A/WT}$ -Gruppe ($p=0,08$). Auch zu Zeitpunkt 2 besteht eine statistisch größere Immobilität der homozygot transgenen Gruppe ($M=293,8$ s \pm 36,9 s; 13,0%) gegenüber der Referenzgruppe ($M=260,1$ s \pm 41,0 s) ($p=0,004^{**}$). Zu allen Testzeitpunkten zeigte sich kein Unterschied zwischen den transgenen Gruppen.

Im Vergleich der Mittelwerte zwischen den Testzeitpunkten fallen steigenden Immobilitätszeiten aller Gruppen auf. Eine Ausnahme bildete die $STAT1^{F77A/F77A}$ -Gruppe an t_3 , da die Tiere entgegen des Trends der anderen Gruppen hier wieder kürzer Floating-Verhalten zeigten.

Zur Analyse der Immobilitätszeit gehörte auch die Anzahl der durchgeführten Verhaltensänderungen zum Parameter Floating (Floating-counts), da nur die Kombination dieses Parameters mit der Betrachtung der Immobilitätszeit ein aussagekräftiges Resultat über das depressionsassoziierte Floating lieferte. Tabelle 29 stellt die Anzahl der Episoden mit Floating-Verhalten im Forced-Swim-Test mit Standardabweichung dar.

Floating-Counts	WT/WT (n=26)	F77A/WT (n=24)		F77A/F77A (n=25)	
Testzeitpunkt	M \pm SD	M \pm SD	p	M \pm SD	p
1	165,8 \pm 41,0	189,1 \pm 58,7	0,290	179,0 \pm 45,6	1,000
2	179,5 \pm 68,3	151,6 \pm 64,3	0,415	154,2 \pm 64,0	0,522
3	160,7 \pm 65,3	168,1 \pm 73,5	1,000	188,8 \pm 84,7	0,552

Tabelle 29: Die Immobilitätsfrequenzen im Forced-Swim-Test. Die Tabelle zeigt die Häufigkeit der Verhaltensänderungen zum Parameter Floating (M) mit Standardabweichung (SD) sowie die Gruppengröße (n) und die Ergebnisse der Post-Hoc-Vergleichstests (p). Statistische Unterschiede waren in dieser Messgröße nicht nachzuweisen.

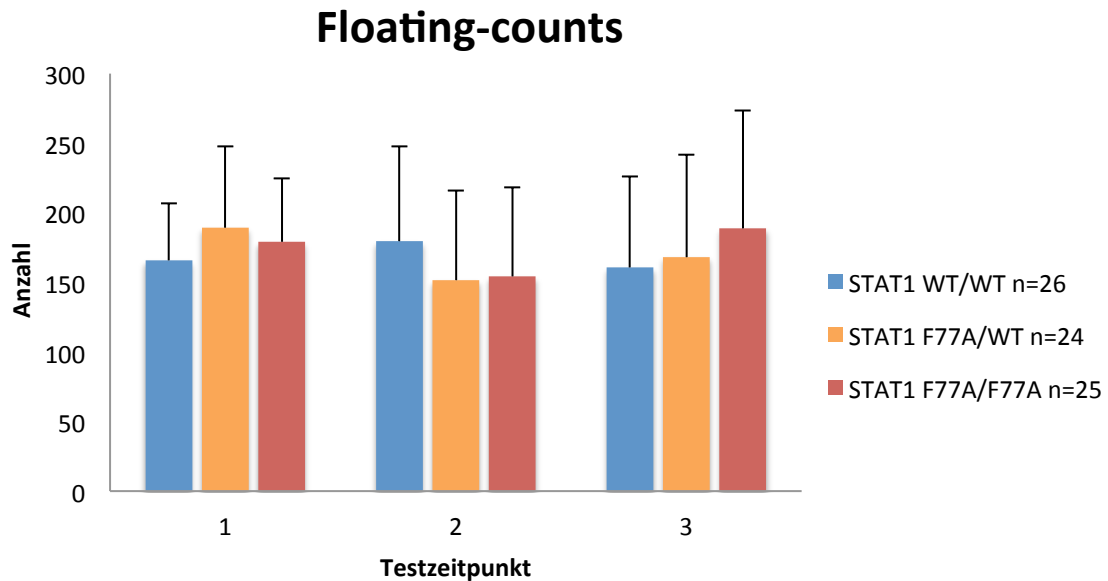


Abb. 29: Alle Testgruppen suchen in ähnlicher Häufigkeit die Immobilität. Im Forced-Swim-Test wurde das Verhalten von 75 männlichen Mäusen über 6 Minuten beobachtet. Getrennt nach Genotypen sind die summierten Verhaltensänderungen der Wildtyp-Tiere ($\text{STAT1}^{\text{WT/WT}}$ blau), der heterozygoten ($\text{STAT1}^{\text{F77A/WT}}$ orange) und der homozygoten ($\text{STAT1}^{\text{F77A/F77A}}$ rot) Gruppe im Säulendiagramm aufgezeigt. Nach der statistischen Analyse unterscheiden sich die Genotypen nicht in den Verhaltensänderungen.

Die Auswertung der Änderungsfrequenz zum Floating-Verhalten zeigte nach der statistischen Analyse mittels ANOVA keine Differenzen der Testgruppen zueinander (t_1 : $F_{2/72}=1,429$; $p=0,246$; t_2 : $F_{2/72}=1,396$; $p=0,254$; t_3 : $F_{2/72}=0,959$; $p=0,388$). Die $\text{STAT1}^{\text{F77A/F77A}}$ -Tiere änderten entsprechend nach Abbildung 29 mit gleicher Häufigkeit ihr Verhalten zu Floating, wobei sie signifikant längere Zeitspannen innerhalb des Forced-Swim-Tests mit depressionsähnlichem Immobilitätsverhalten verbrachten (Abb. 28).

Im nächsten Teil der Auswertung des Forced-Swim-Tests folgt der Aktivitätsparameter Swimming. In Tabelle 30 ist die mittlere Zeit in Sekunden, welche die Testmäuse mit Swimming verbrachten, dargestellt.

Swimming-Zeit [s]	WT/WT (n=26)	F77A/WT (n=24)		F77A/F77A (n=25)	
Testzeitpunkt	M ± SD	M ± SD	p	M ± SD	p
1	103,8 ± 28,8	89,8 ± 31,6	0,221	84,2 ± 20,4	0,038
2	84,4 ± 35,5	71,5 ± 33,1	0,444	56,3 ± 23,7	0,006
3	66,4 ± 29,3	70,0 ± 27,6	1,000	71,2 ± 33,4	1,000

Tabelle 30: Absolute Swimming-Zeiten im Forced-Swim-Test. Gezeigt sind die Mittelwerte (M) mit Standardabweichung (SD) und die multiplen Paarvergleiche zwischen den transgenen Gruppen und der Referenzgruppe (p). Letzterer zeigte signifikante p-Werte an Testzeitpunkt 1 und 2.

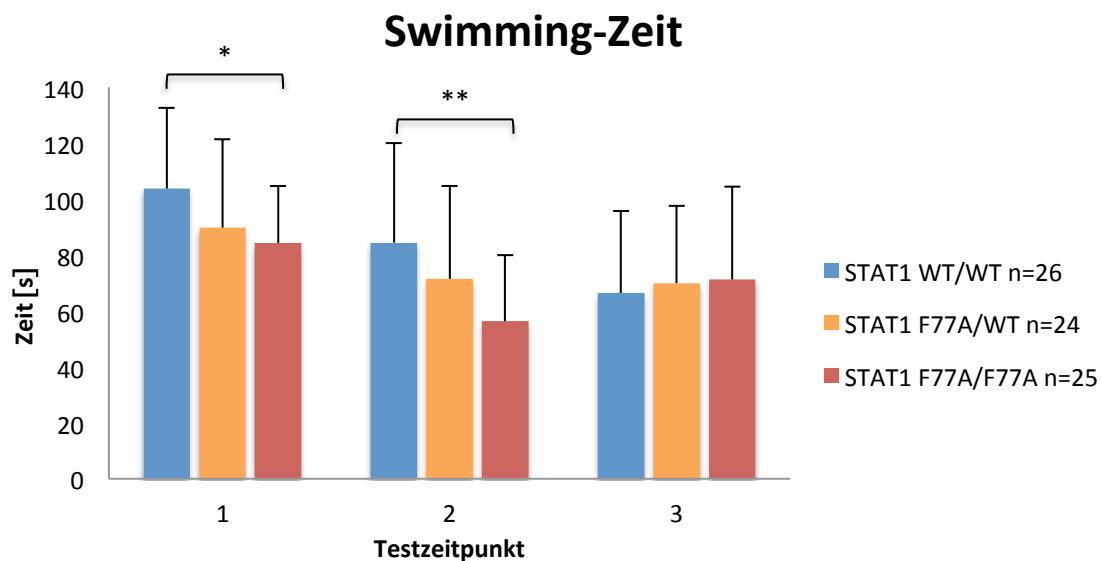


Abb. 30 Die Mutation STAT1^{F77A} verursacht eine verminderte Swimming-Aktivität im Forced-Swim-Test. Im 6-minütigen FST wurden 26 Wildtyp-Mäuse (blau) sowie 24 heterozygote (orange) und 25 homozygote Tiere (rot) am Alter von 8, 12 und 16 Wochen getestet. Dargestellt im Säulendiagramm ist die Swimming-Zeit [s] der drei Versuchsgruppen an drei Messzeitpunkten. Die Kontrollgruppe schwamm an den ersten beiden Messpunkten in Relation zu den STAT1^{F77A/F77A}-Mäusen signifikant länger.

An den ersten beiden Testzeitpunkten schwammen die STAT1^{F77A/F77A}-Tiere nach Abbildung 30 (t_1 : 103,8 s ± 28,8 s; t_2 : 84,4 s ± 35,5 s) im Bezug zu den Kontrolltieren (t_1 : 84,2 s ± 30,4 s; t_2 : 56,3 s ± 23,7 s) deutlich kürzer. Dieser Unterschied wurde auch im statistischen Vergleich durch eine einfaktorielle ANOVA deutlich. Er erbrachte signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Alter von 8 und 12 Wochen (t_1 : $F_{2/72}=3,481$; $p=0,036^*$ und t_2 : $F_{2/72}=5,182$; $p=0,008^{**}$). Nach Bonferroni-korrigierten Paarvergleichen beruhten die Unterschiede auf signifikant niedrigeren Swimming-Zeiten der homozygot transgenen Gruppe ($p=0,038^*$ und $p=0,006^{**}$). Am letzten Testzeitpunkt bestanden keine signifikanten Differenzen (t_3 : $F_{2/72}=0,174$; $p=0,841$) der Testgruppen zueinander. Die durchschnittliche Swimming-Zeit aller Testgruppen fiel zwi-

schen den Zeitpunkten, lediglich die STAT1^{F77A/F77A}-Tiere schwammen zum letzten Zeitpunkt wieder länger.

Erneut wurden zur genaueren Analyse des Parameters Swimming auch die Häufigkeit der Verhaltensänderung betrachtet. Tabelle 31 zeigt diese Messgröße aufgeteilt nach Genotyp und Testgruppe.

Swimming-Counts	WT/WT (n=26)	F77A/WT (n=24)		F77A/F77A (n=25)	
Testzeitpunkt	M ± SD	M ± SD	p	M ± SD	p
1	256,9 ± 51,0	261,8 ± 68,6	1,000	240,2 ± 58,2	0,960
2	247,0 ± 88,2	206,5 ± 88,3	0,284	200,9 ± 75,8	0,165
3	217,7 ± 97,3	218,0 ± 85,8	1,000	250,3 ± 102,0	0,681

Tabelle 30: Episodenanzahl der Änderungen zum Verhalten Swimming. Dargestellt sind die mittleren Änderungen (M) mit Standardabweichung (SD), die Gruppenstärke (n) und die p-Werte der multiplen Vergleichstests (p). Letztere zeigen keine Differenzen zwischen den Testgruppen.

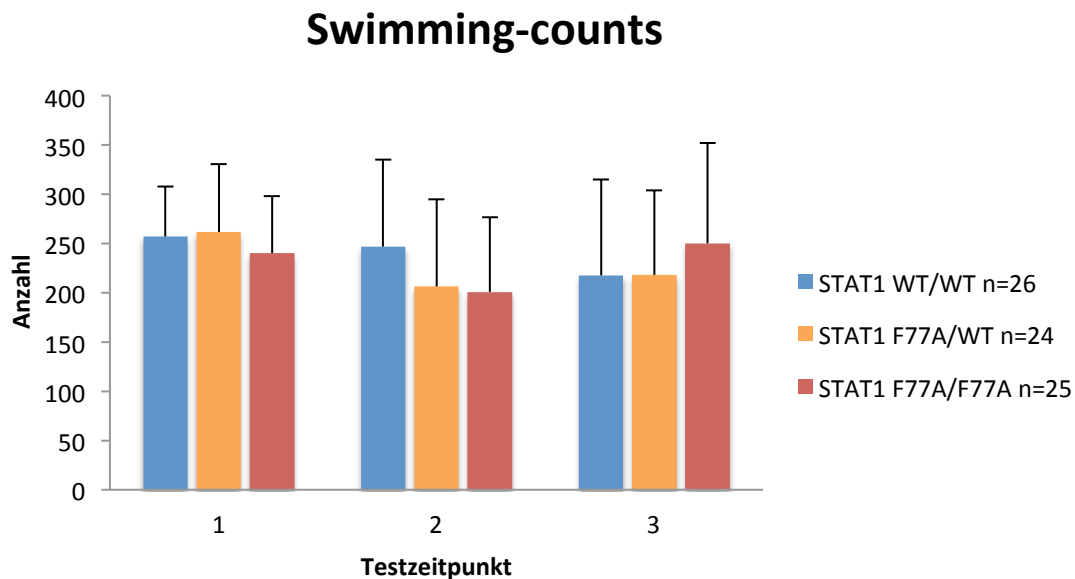


Abb. 31: Mittlere Summe der Verhaltensänderungen zum Swimming. Im Säulendiagramm ist die Anzahl dargestellt, mit der die Versuchstiere das Verhalten Swimming initiiert haben. Die Unterteilung erfolgt nach Genotyp (blau=STAT1^{WT/WT}, orange=STAT1^{F77A/WT}, rot=STAT1^{F77A/F77A}) und Testzeitpunkt (8, 12 und 16 Wochen). Nach der Analyse ändern alle Gruppen in gleicher Häufigkeit ihr Verhalten.

Sowohl im zeitlichen Verlauf als auch zwischen den Genotypen lagen zu den einzelnen Messzeitpunkten in Abbildung 31 keine Differenzen vor. Für letztere wurde eine ein-faktorielle Varianzanalyse zum statistischen Vergleich der Genotypen durchgeführt,

welche keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen aufwies (t_1 : $F_{2/72}=0,896$; $p=0,413$; t_2 : $F_{2/72}=2,268$; $p=0,111$; t_3 : $F_{2/72}=0,965$; $p=0,386$). Die Mäuse mit homozygoter $STAT1^{F77A/F77A}$ -Mutation zeigten im Alter von 8 und 12 Wochen eine Reduktion des Swimming-Verhaltens um 18,9% und 33,3% bei gleicher Initiationsfrequenz.

Neben dem Swimming gilt das Struggling als weiterer valider Parameter aktiven Verhaltens eines Nagers im Forced-Swim-Test. Gleichzeitig erwiesen sich beide Verhaltensparameter als sensitiv für die Untersuchung von Effekten moderner Antidepressiva, wie SSRIs (Detke et al., 1997). Tabelle 32 zeigt die deskriptive Analyse der absoluten Struggling-Zeit aller Testgruppen und die statistischen Paarvergleiche zwischen Referenz- und transgenen Gruppen.

Struggling-Zeit [s]	WT/WT (n=26)	F77A/WT (n=24)		F77A/F77A (n=25)	
Testzeitpunkt	M ± SD	M ± SD	p	M ± SD	p
1	19,3 ± 6,6	14,0 ± 6,3	0,022	11,7 ± 7,2	0,000
2	15,5 ± 8,2	11,8 ± 9,3	0,261	9,9 ± 4,1	0,032
3	13,8 ± 13,0	11,2 ± 6,8	1,000	14,0 ± 9,1	1,000

Tabelle 32: Absolute Struggling-Zeiten im Forced-Swim-Test. Unterteilt nach Genotyp und Testzeitpunkten zeigt die Tabelle die Struggling-Zeiten [s] im sechsminütigen Forced-Swim-Test mit Standardabweichung, Gruppenstärke (n) und statistischem Vergleich zwischen $STAT1^{WT/WT}$ und $STAT1^{F77A/WT}$ sowie $STAT1^{F77A/F77A}$ (p). Die p-Werte zeigen signifikante Differenzen in der Struggling-Dauer zwischen den Kontrolltieren und den homozygoten $STAT1^{F77A/F77A}$ -Mäusen im Alter von 8 und 12 Wochen sowie den Wildtyp-Tieren und den heterozygoten $STAT1^{F77A/WT}$ -Mäusen im Alter von 12 Wochen.

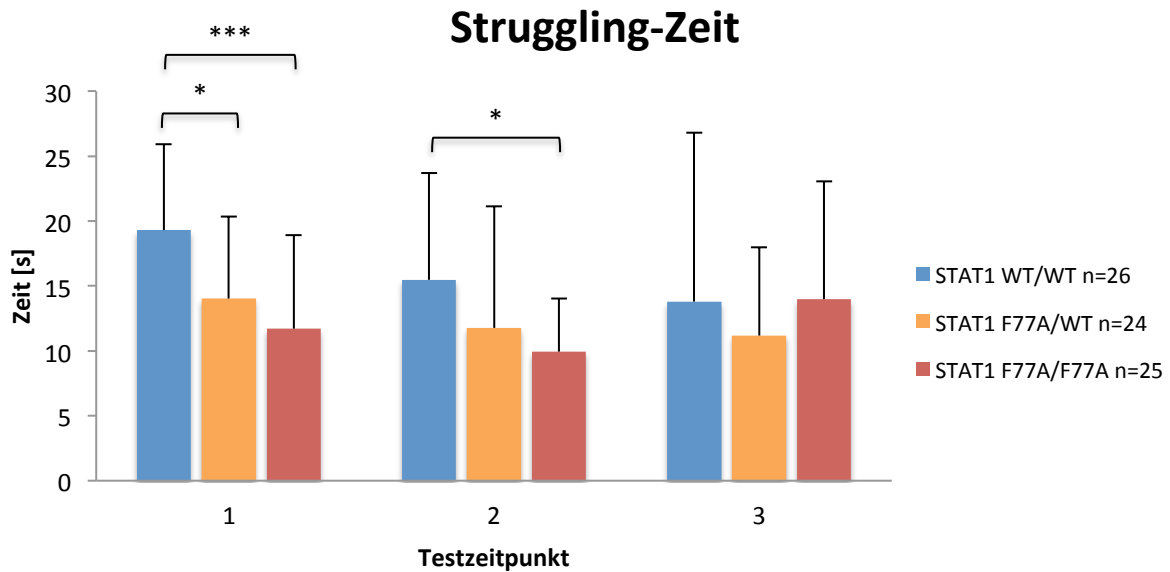


Abb. 32: Die STAT1^{F77A/F77A}-Tiere zeigen im Forced-Swim-Test eine reduzierte Struggling-Dauer. Dargestellt im Säulendiagramm sind die mittleren Struggling-Zeiten der Wildtyp-Tiere (STAT1^{WT/WT}=blau), der heterozygoten (STAT1^{F77A/WT}=orange) sowie der homozygot transgenen Tiere (STAT1^{F77A/F77A}=rot) im Alter von 8, 12 und 16 Wochen. Zu den ersten beiden Testzeitpunkten versuchten die STAT1^{F77A/F77A}-Tiere signifikant kürzer aus den Gefäßen zu entkommen (gekennzeichnet mit *** und *). Auch die heterozygote Gruppe verbrachte kürzere Zeitspannen mit aktivem Fluchtverhalten im Alter von 8 Wochen (gekennzeichnet mit *).

Mit Ausnahme der STAT1^{F77A/F77A}-Gruppe zum letzten Messpunkt zeigten alle drei Testgruppen nach Abbildung 32 über die Versuchsdauer jeweils eine Tendenz zu verkürzten Struggling-Zeiten. Im Vergleich der Mittelwerte wiesen die homozygot transgenen Tiere die kürzesten Zeitspannen innerhalb dieses Verhaltensmusters auf. Die Differenzen im Alter von 8 Wochen zwischen den Gruppen zum Messzeitpunkt 1 bestätigte die durchgeführte ANOVA durch den Nachweis statistisch signifikanter Unterschiede (t_1 : $F_{2/72}=8,523$; $p<0,001^{***}$). Der paarweise Bonferroni-Post-Hoc-Testvergleich erbrachte für die STAT1^{F77A/F77A} ($M=11,7 \text{ s} \pm 7,2 \text{ s}$) und die heterozygote (STAT1^{F77A/WT}) Gruppe ($M=14,0 \text{ s} \pm 6,3 \text{ s}$) signifikant kürzere Struggling-Zeiten als die Referenzgruppe ($M=19,3 \text{ s} \pm 6,6 \text{ s}$). Auch am zweiten Testzeitpunkt gründeten sich die Unterschiede in der Varianzanalyse zwischen den Genotypen ($F_{2/72}=3,569$; $p=0,033$) nach multiplen-Tamhane-T2-Vergleichstests auf signifikant weniger aktivem Struggling der homozygoten STAT1^{F77A/F77A}-Gruppe im Bezug zu den Kontrolltieren ($p=0,032^*$). Am dritten Testzeitpunkt bewirkte der jeweilige Genotyp keine Differenzen zwischen den Testgruppen (t_3 : $F_{2/72}=0,595$; $p=0,701$). Die beiden transgenen Gruppen zeigten keine Unterschiede im aktiven Fluchtverhalten über die gesamte Testdauer ($p=0,701$).

Zusammenfassend löste die Mutation $\text{STAT1}^{\text{F77A}}$ in den ersten beiden Testexpositionen weniger aktives Struggling-Verhalten im FST aus.

Zur Komplettierung der Analyse des Struggling-Verhaltens folgen in Tabelle 33 die summierten Verhaltensänderungen zum Struggling (Anzahl der Struggling-Episoden/Struggling-Counts).

Struggling-Counts	WT/WT (n=26)	F77A/WT (n=24)		F77A/F77A (n=25)	
Testzeitpunkt	M ± SD	M ± SD	p	M ± SD	p
1	94,2 ± 19,0	77,7 ± 23,0	0,100	69,9 ± 35,7	0,006
2	72,1 ± 33,3	61,1 ± 41,7	0,744	56,4 ± 22,6	0,293
3	63,2 ± 43,6	55,7 ± 30,1	1,000	72,7 ± 36,6	1,000

Tabelle 33: Die Episoden an Struggling-Verhalten im Forced-Swim-Test. Aufgezeigt sind neben der Gruppengröße (n) und den Mittelwerten mit Standardabweichung (M \pm SD) die p-Werte der Vergleichstests zwischen der Referenzgruppe der Wildtyp-Tiere und der beiden transgenen Gruppen (p). Die Wildtyp-Tiere wechselten im Alter von 8 Wochen signifikant häufiger ihr Verhalten.

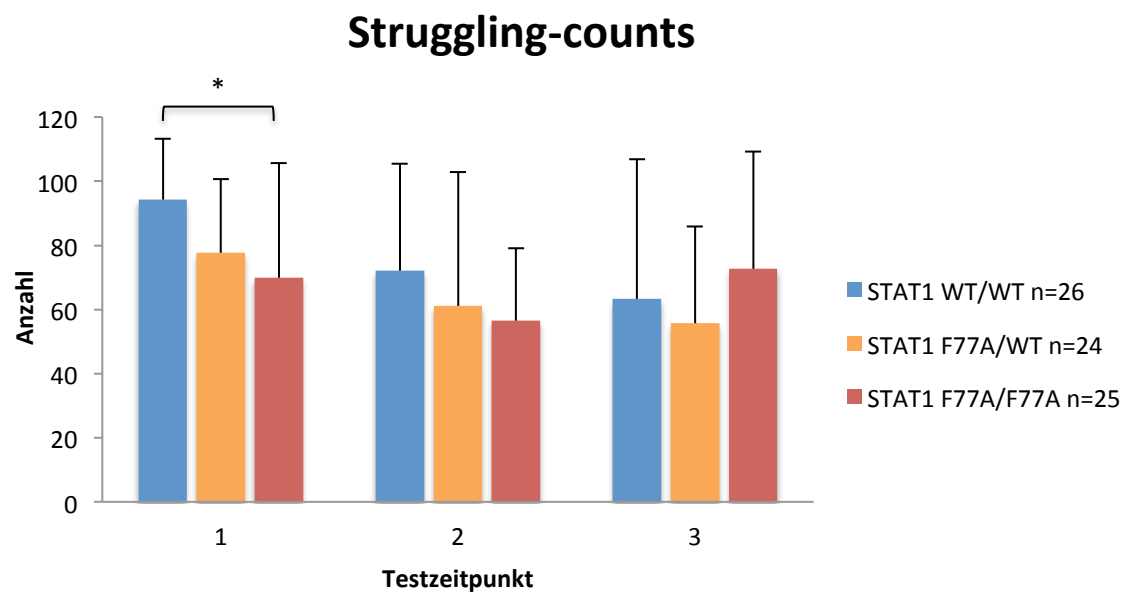


Abb. 33: Anzahl der Struggling-Episoden im Forced-Swim-Test. Im 6-minütigen FST wurden 26 Wildtyp-Mäuse (blau) sowie 24 heterozygote (orange) und 25 homozygote Tiere (rot) im Alter von 8, 12 und 16 Wochen getestet. Im Säulendiagramm ist die Swimming-Zeit [s] der drei Versuchsgruppen im Alter von 8, 12 und 16 Wochen dargestellt. Die Kontrollgruppen zeigten signifikant mehr Verhaltensänderungen am ersten Messzeitpunkt in Relation zu den $\text{STAT1}^{\text{F77A/F77A}}$ -Mäusen.

Nach dem statistischen Vergleich der in Abbildung 33 dargestellten Struggling-Episoden durch die einfaktorielle ANOVA bestanden zum Zeitpunkt t_1 signifikante Un-

terschiede zwischen den Gruppen. Die Referenzgruppe der Wildtyp-Tiere zeigte nach Bonferroni-Paarvergleich mehr Verhaltensänderungen als die STAT1^{F77A/F77A}-Gruppe (p=0,006**). An den restlichen Zeitpunkten wechselten die Versuchsgruppen ihr Verhalten in ähnlicher Frequenz (t₁: F_{2/72}=5,456; p=0,006**; t₂: F_{2/72}=2,268; p=0,111; t₃: F_{2/72}=0,965; p=0,386). Insgesamt zeigten die STAT1^{F77A/F77A}-Mäuse im Alter von 8 und 12 Wochen ein um 39,4% und 36,1% reduziertes Fluchtverhalten im FST in verminderter Länge und zu einem Zeitpunkt auch in 25,7% geringer Frequenz.

Zur Bestätigung der Ergebnisse des Forced-Swim-Test wurde zusätzlich zum eingesetzten Verfahren die ursprüngliche Auswertungsmethode nach Porsolt und Kollegen angewendet. Diese Analyse misst die Immobilität der Versuchstiere innerhalb der letzten vier Testminuten und betrachtet die ersten beiden Minuten als Adaptationszeit an die experimentelle Situation. Tabelle 34 zeigt die Floatingzeiten der Versuchsgruppen in den Testminuten 3-6.

Immobilitätszeit letzte 4min [s]	WT/WT (n=26)	F77A/WT (n=24)		F77A/F77A (n=25)	
Testzeitpunkt	M ± SD	M ± SD	p	M ± SD	p
1	188,8 ± 24,8	196,1 ± 26,2	0,833	208,1 ± 19,4	0,014
2	186,0 ± 26,7	201,0 ± 28,3	0,101	211,3 ± 16,7	0,001
3	199,1 ± 27,1	201,0 ± 22,7	1,000	197,6 ± 30,3	1,000

Tabelle 34: Immobilitätsdauer in den letzten vier Testminuten. Dargestellt sind die Floatingzeit der letzten vier Minuten gemäß der Auswertung nach Porsolt mit Standardabweichung (M±SD) und das Signifikanzniveau der multiplen Vergleichstestungen (p). Signifikante Unterschiede bestanden an den ersten beiden Messpunkten zwischen der STAT1^{F77A/F77A}- und der Kontrollgruppe.

Immobilitätszeit in den letzten 4 Minuten

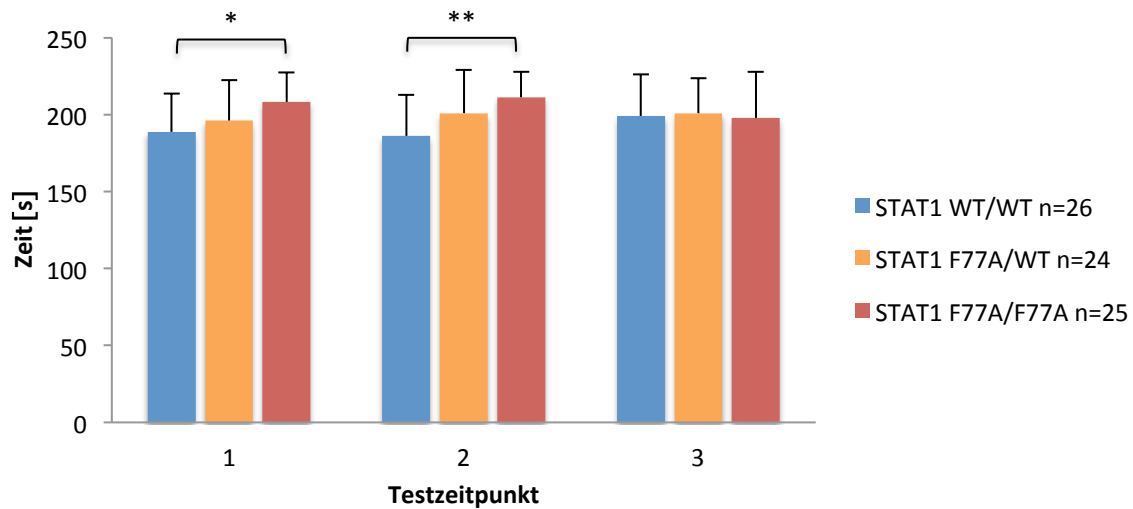


Abb. 34: Die Mutation STAT1^{F77A} verlängert die Immobilitätsdauer in den letzten vier Testminuten des Forced-Swim-Tests. Die Floatingzeit der letzten 4 Testminuten im FST der 26 Wildtyp-Mäuse (blau) sowie der 24 heterozygoten (orange) und der 25 homozygoten Mäuse (rot) im Alter von 8, 12 und 16 Wochen ist im Säulendiagramm aufgetragen. Im Alter von 8 und 12 Wochen zeigten die homozygoten transgenen Tiere eine verlängertes immobiles Verhalten (gekennzeichnet als * und **).

Auch die Auswertung der letzten vier Testminuten in Abbildung 34 nach Auslassung einer zweiminütigen Eingewöhnungszeit (Porsolt et al., 1977a) bestätigte die Ergebnisse der vorangegangenen Analysen. In beiden initialen Messungen zeigten die STAT1^{F77A/F77A}-Gruppen nach der einfaktoriellen Varianzanalyse um 10,2% und 13,6% signifikant längere Floatingzeiten in diesem Testintervall (t_1 : $F_{2/72}=4,345$; $p=0,017^*$; t_2 : $F_{2/72}=6,295$; $p=0,022^*$). Der Bonferroni-Post-Hoc-Vergleich bekräftigte den depressionsähnlichen Phänotyp der STAT1^{F77A/F77A}-Mäuse mit signifikant längeren Immobilitätszeiten gegenüber der Referenzgruppe aus STAT1-Wildtyp-Tieren ($p=0,014^*$ und $p=0,001^{**}$). Für den letzten Testzeitpunkt ließen sich weiterhin keine Differenzen der Floating-Zeiten nachweisen (t_3 : $F_{2/72}=0,092$; $p=0,912$). Auch die graphische Betrachtung der Immobilitätszeiten des finalen vierminütigen Testintervalls weist konkordante Resultate zu den übrigen FST-Messgrößen auf (vgl. Abb. 34). Erneut tritt nach konstanten Differenzen im Alter von 8 und 12 Wochen am letzten Messzeitpunkt eine Angleichung der Floating-Zeiten zwischen den Testgruppen auf.

Die Analyse des Forced-Swim-Tests erfolgte zusätzlich nach der Split-half-Methode, die eine getrennte Auswertung aller Messparameter in beiden Testhälften (0-180 s und 180-360 s) beinhaltet. Da die Analyse dieser Ergebnisse keine neuen wesentlichen Erkenntnisse erbrachte, sondern die bereits beschriebenen Resultate und Interpretatio-

nen des Forced-Swim-Tests unterstützte, soll auf eine detaillierte Darstellung verzichtet werden.

Im Lebensalter von 8 und 12 Wochen zeigten die homozygoten $\text{STAT1}^{\text{F77A/F77A}}$ -Mäuse signifikant längeres Floating sowie verkürztes Swimming und Struggling. Auch die heterozygote Gruppe der $\text{STAT1}^{\text{F77A/WT}}$ -Tiere versuchte signifikant kürzer das Testgefäß zu verlassen. Alle Messgrößen des FST zeigten für die $\text{STAT1}^{\text{F77A}}$ -Gruppen konstante Resultate, die eine einheitliche Verhaltensinterpretation zulassen.

In der zusammenfassenden Betrachtung der Ergebnisse des Baseline-Tests mit unstimulierten Mäusen präsentierte die Versuchsgruppe der $\text{STAT1}^{\text{F77A/F77A}}$ -Mäuse keine motorischen oder koordinativen Schwächen im Rotarod-Test. Sowohl die Explorations- und Bewegungsaktivität im Offenfeld, als auch die Analyse der angstassoziierten Parameter zeigte keine grundlegenden Beeinträchtigungen oder Verhaltensänderungen der $\text{STAT1}^{\text{F77A}}$ -Mauslinie. Im Vergleich mit den Literaturwerten der sozialen Interaktionsaktivität von STAT1 -Wildtyp-Pendants suchte die getestete Mauslinie seltener den Kontakt, hielt diesen allerdings für eine längere Zeitspanne aufrecht. Bei den untersuchten Paaren mit jeweils einem transgenen Testpartner gingen die Pärchen mit einer $\text{STAT1}^{\text{F77A/F77A}}$ -Maus zu einem Testzeitpunkt häufiger soziale Interaktionen ein. Im depressionsassoziierten Forced-Swim-Test verhielten sich die $\text{STAT1}^{\text{F77A/F77A}}$ -Testtiere weniger aktiv und verblieben signifikant länger immobil in der Testsituation.

3.8 Überlebensrate und Verhalten nach Lipopolysaccharid-Exposition

Die systemischen Konsequenzen der $\text{STAT1}^{\text{F77A}}$ -Mutation auf die *In-vivo*-Überlebensrate einer gramnegativen bakteriellen Sepsis-Erkrankung wurden im LPS-Überlebenstest evaluiert. Abbildung 35 zeigt die Überlebensdaten von insgesamt 48 Versuchsmäusen im Alter von 6-8 Monaten aufgeteilt in vier Testgruppen. Jeweils zwölf homozygote $\text{STAT1}^{\text{F77A/F77A}}$ - und zwölf $\text{STAT1}^{\text{WT/WT}}$ -Mäuse wurden an Tag 1 der Testabfolge mit 300 µg LPS behandelt. Zwölf weitere Tiere der gleichen Genotypen erhielten zeitgleich eine Kontrollbehandlung durch eine intraperitoneale Injektion von 0,9% NaCl-Lösung. An den folgenden Versuchstagen (Tag 2-10) wurde einmal täglich die Überlebensrate dokumentiert und eine klinische Verhaltensbeobachtung durchgeführt.

Überlebensrate einer gramnegativen Sepsis

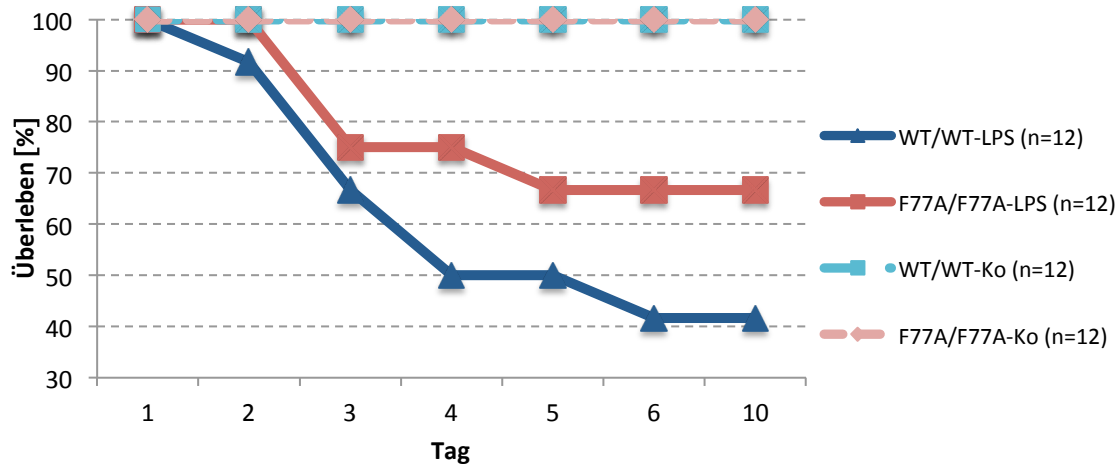


Abb. 35: Ein STAT1-Oligomerisierungsdefekt resultiert in einer erhöhten Überlebensrate einer gramnegativen Sepsis. Durch die Injektion von 300 µg LPS in Versuchsmäusen wurde eine artifizielle gramnegative Infektion ausgelöst. Getestet wurden jeweils zwölf Tiere des Genotyps $\text{STAT1}^{\text{F77A/F77A}}$ sowie $\text{STAT1}^{\text{WT/WT}}$. Außerdem sind auch die Überlebensraten der mit 0,9% NaCl-Lösung behandelten Kontrolltiere (Ko) gezeigt. Im Liniendiagramm ist das prozentuale Überleben der 6-8 Monate alten Testgruppen über den zehntägigen Testzeitraum aufgetragen. Die transgene $\text{STAT1}^{\text{F77A-F77A}}$ -Mauslinie zeigt eine verminderte Sterblichkeit der induzierten gramnegativen Sepsis. Die kontrollbehandelten Tiere weisen eine vollständige Überlebensrate auf.

Abbildung 35 zeigt eine höhere Überlebensrate (66,7% versus 41,7%) der homozygoten Testtiere ($\text{STAT1}^{\text{F77A/F77A}}$) im Vergleich mit den Kontrolltieren ($\text{STAT1}^{\text{WT/WT}}$). Zusätzlich traten die ersten Sterbefälle in der Referenzgruppe im Vergleich mit der transgenen Gruppe zeitlich früher auf. Auch die nicht näher beschriebenen klinischen Beobachtungen zeigten einen schwereren Krankheitszustand der Kontrolltiere $\text{STAT1}^{\text{WT/WT}}$. Diese Erhebung beinhaltet die Analyse der Atem- und Herzfrequenz, die Kontrolle des Struppigkeitszustands des Fells und der Fäkalrückstände am Darmausgang. Die mit NaCl-behandelten Kontrollgruppen präsentierten keine Krankheitsanzeichen und wiesen eine Überlebensrate von 100% auf. Die Erhebung der Überlebensdaten an Tag 10 zeigte identische Resultate zu Tag 6 und deutete somit auf eine überstandene LPS-Behandlung in dieser Zeitspanne hin. Änderungen der Überlebensrate waren anschließend nicht zu erwarten. Insgesamt bewirkte die Mutation $\text{STAT1}^{\text{F77A}}$ ein gesteigertes Überleben der LPS-induzierten Infektion.

In Erweiterung des vorher beschriebenen Überlebenstests überprüfte eine zweite Versuchsreihe den Einfluss von Lipopolysaccharid (LPS) auf die Gewichtsentwicklung und die motorischen Offenfeld-Leistungen der $\text{STAT1}^{\text{F77A}}$ -Mauslinie im Vergleich zu Wild-

typ-Kontrollen. Die Gewichtsanalyse wurde dabei zur Kontrolle der organismischen Toxinwirkungen auf die Testtiere genutzt. Im 15-minütigen Offenfeldtest lieferten die Messgrößen der Gesamtdistanz, des Aktivitätsanteils, der Beschleunigungsfrequenz und der vertikalen Aktivität Hinweise auf die motorische und emotionale Beeinträchtigung des Sickness-Behavior. Das Einsetzen einer Lethargie und somit der Rückgang aller Aktivitätsparameter des Offenfeldes deuteten auf die Ausbildung von Sickness-Behavior hin (Hart, 1988). Zusätzlich sprach ein Ausbleiben arttypischer Verhaltensweisen wie Schnüffeln, Fellputzen und Exploration der Versuchstiere für einen Krankheitszustand der Versuchsmäuse. Letztere Parameter wurden in dieser Arbeit lediglich klinisch beobachtet.

Am ersten Messzeitpunkt (Tag 1) wurden die Ausgangswerte der Testmäuse im unbehandelten Zustand erhoben. An den Tagen 2-6 folgte die Verhaltenserfassung der kranken Tiere im 24-stündigen Rhythmus und an Tag 10 sollte das Verhalten der rekonvalleszenten Tiere gemessen werden. Die käuflich erworbenen Wildtyp-Tiere konnten im Gegensatz zum Baseline-Test in die statistische Analyse eingeschlossen werden, da sie sich im Ausgangsgewicht und der Basisleistung im OFT nicht von den im BMFZ geborenen Tieren unterschieden. Es wurden insgesamt zwei Behandlungen (LPS und NaCl-Kontrolle) und drei Genotypen ($STAT1^{WT/WT}$; $STAT1^{F77A/WT}$; $STAT1^{F77A/F77A}$) verglichen, daher konnten sechs unterschiedliche Gruppen gebildet werden.

Grundsätzlich wurde für jeden Parameter primär eine dreifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung auf den zeitlich messwiederholten Mittelwerten über die gesamte Zeitdauer durchgeführt. Darauf schloss sich die Überprüfung der nicht-messwiederholten Haupteffekte (Genotyp, Behandlung, Kombination Genotyp und Behandlung) auf die durchschnittlichen Gesamtwerte aller Messzeitpunkte an. Für eine spezifische Untersuchung der Gruppen zu jedem einzelnen Testzeitpunkt folgte die Durchführung einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA). Im Falle einer signifikanten Interaktion der Faktoren Behandlung und Genotyp wurde eine Post-Hoc-Analyse gemäß der „single effects analysis“ getrennt nach Behandlung durchgeführt. Hierfür wurden die LPS-behandelten Versuchsgruppen miteinander verglichen. Die messwiederholte Varianzanalyse musste bei konstanter Verletzung der Sphärizität im Mauchly-Test mit nach Greenhouse-Geisser korrigierten Freiheitsgraden ausgeführt werden.

Als erster Parameter des Expositionstests wurde das Körpergewicht der Testtiere analysiert. Die Entwicklung dieser Messgröße über die Testdauer unterteilt nach Behandlung und Genotyp ist in Tabelle 35 dargestellt.

Gewicht [g]	WT/WT		F77A/WT		F77A/F77A	
	NaCl (n=10)	LPS (n=10)	NaCl (n=10)	LPS (n=10)	NaCl (n=10)	LPS (n=9)
Tag	M ± SD	M ± SD	M ± SD	M ± SD	M ± SD	M ± SD
1	24,2 ± 2,03	24,2 ± 2,0	26,8 ± 1,8	28,3 ± 2,7	26,5 ± 2,6	27,1 ± 3,0
2	24,8 ± 2,01	22,0 ± 2,2	27,1 ± 1,8	26,6 ± 2,5	27,0 ± 2,8	25,0 ± 3,2
3	24,9 ± 1,85	20,6 ± 1,9	27,3 ± 1,6	25,0 ± 2,6	26,8 ± 2,6	23,1 ± 3,0
4	24,8 ± 1,76	20,8 ± 1,8	27,4 ± 1,5	24,6 ± 2,9	27,1 ± 2,6	23,3 ± 2,5
5	24,6 ± 1,80	21,8 ± 1,7	27,4 ± 1,7	24,8 ± 3,0	27,2 ± 2,5	24,7 ± 2,5
6	24,3 ± 2,33	22,8 ± 1,6	27,4 ± 1,7	25,7 ± 2,9	27,3 ± 2,7	25,3 ± 2,5
10	25,2 ± 2,16	24,1 ± 1,2	28,6 ± 1,8	27,5 ± 2,1	28,0 ± 2,9	26,9 ± 2,0

Tabelle 35: Die Gewichtsentwicklung während des Expositionstests. Jeweils vor der Verhaltenserfassung wurde das Gewicht der Versuchstiere erhoben. Die Tabelle zeigt die mittleren Körpergewichte [g] mit Standardabweichung (M±SD) aufgeteilt nach Genotyp (STAT1^{WT/WT}; STAT1^{F77A/WT}; STAT1^{F77A/F77A}) und Behandlung (NaCl versus LPS).

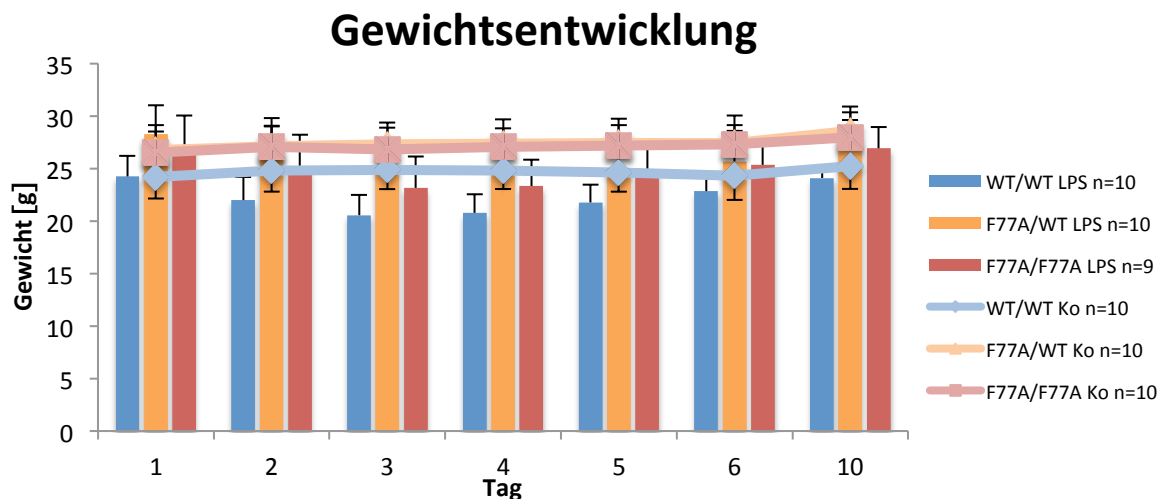


Abb. 36: Die Körpergewichtsentwicklung der Versuchsgruppen im Expositionstest. Getestet wurden insgesamt 59 männliche C57Bl/6-Mäuse unterteilt nach drei Genotypen (STAT1^{WT/WT} (n=20), STAT1^{F77A/WT} (n=20) und STAT1^{F77A/F77A} (n=19)) und nach zwei Behandlungsformen LPS (n=29) und NaCl (n=30). Die Testdauer betrug 15 Minuten und die Zeit zwischen zwei Testdurchgängen 24 h. Die Behandlung mit 5 mg LPS/kg Körpergewicht oder einem äquivalenten Volumen 0,9% NaCl-Lösung erfolgte unmittelbar nach der Gewichtserfassung am Tag 1. Im kombinierten Linien- und Säulendiagramm ist die mittlere Beschleunigungsanzahl aufgetragen, wobei die Linien die kontrollbehandelten und die Säulen die LPS-behandelten Gruppen darstellen. Die statistische Analyse zeigte dauerhaft signifikant höhere Körpergewichte der transgenen Gruppen gegenüber der Kontrollgruppe. Zur besseren Übersichtlichkeit sind keine Signifikanzbalken dargestellt.

Abbildung 36 zeigt die Betrachtung der Körpergewichtsentwicklung über die gesamte Testdauer. In der nach Greenhouse-Geisser korrigierten Varianzanalyse mit Messwiederholung fand sich eine deutliche Änderung der Gewichte zwischen den Testzeitpunkten ($F_{3,2/169,8}=94,63$; $p<0,001^{***}$). Hierbei übten die zwei durchgeführten Behandlungen einen unterschiedlichen Effekt auf das Gewicht der drei untersuchten Genotypen aus ($F_{6,4/169,8}=3,71$; $p=0,001^{**}$). Auch die singuläre Betrachtung der Behandlung veränderte den Körpergewichtsverlauf signifikant ($F_{3,2/169,8}=84,10$; $p<0,001^{***}$). Lediglich für den Einzeleffekt des Genotyps lag keine signifikante Änderungen des Parameters vor ($F_{6,4/169,8}=1,66$; $p=0,129$). Eine statistische Auswertung der Gewichtsentwicklung ohne den Bezug der Messwiederholung zeigte signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen ($F_{2/53}=11,73$; $p<0,001^{***}$) ohne einen Einfluss der Behandlung ($F_{2/53}=0,25$; $p=0,782$).

Im folgenden Schritt schloss sich die zweifaktorielle (Behandlung; Genotyp) Varianzanalyse der einzelnen Messzeitpunkte an. In Tabelle 36 sind die statistischen Ergebnisse detaillierter beschrieben.

Gewicht	Genotyp			Behandlung			Behandlung*Genotyp		
Tage	df	F	p	df	F	p	df	F	p
1	2;53	10,550	0,000	1;53	1,332	0,254	2;53	0,479	0,622
2	2;53	10,802	0,000	1;53	7,970	0,007	2;53	1,091	0,343
3	2;53	11,498	0,000	1;53	32,932	0,000	2;53	1,003	0,374
4	2;53	11,074	0,000	1;53	37,000	0,000	2;53	0,413	0,664
5	2;53	10,663	0,000	1;53	20,080	0,000	2;53	0,027	0,974
6	2;53	9,981	0,000	1;53	8,292	0,006	2;53	0,047	0,954
10	2;53	13,676	0,000	1;53	3,216	0,079	2;53	0,023	0,978

Tabelle 36: Statistische Ergebnisse der zweifaktoriellen Varianzanalyse der Körpergewichtsentwicklung. Aufgeteilt nach Genotyp, Behandlung und der Kombination von Behandlung und Genotyp zeigt die Tabelle die Resultate des statistischen Vergleichs der Testgruppen zueinander. Im Speziellen sind die Anzahl der Freiheitsgrade (df), der F- und der p-Wert zu jedem Testzeitpunkt dargestellt.

Im Gegensatz zur messwiederholten Analyse des Körpergewichts war im Vergleich der Testgruppen zu den einzelnen Messzeitpunkten in Tabelle 36 kein Einfluss der Faktorkombination mehr nachweisbar. Allerdings trennte der Genotyp zu allen Messpunkten die Körpergewichte der untersuchten Gruppen signifikant, wobei die transgenen Tiere nach den Resultaten der Post-Hoc-Vergleichstests größere Eigengewichte aufwie-

sen (STAT1^{F77A/WT}: $p < 0,001$; STAT1^{F77A/F77A}: $p = 0,01-0,05$). Erwartungsgemäß senkte die LPS-Behandlung das Körpergewicht der Testtiere nach Injektion bis zum Tag 10 signifikant (Qin et al., 2007; O'Connor et al., 2009b; Fu et al., 2010). Die Hinzunahme des Faktors Genotyp zur Behandlung rief allerdings eine Nivellierung der beschriebenen Unterschiede zwischen den Testgruppen hervor (s. Tabelle 36). Insgesamt differierten die Körpergewichte zwar konstant zwischen den einzelnen Genotypen, die LPS-Behandlung reduzierte das Gewicht der Testgruppen allerdings nur in der messwiederholten statistischen Untersuchung in unterschiedlicher Stärke. Im Gegensatz zum Baseline-Test konnten in diesem Versuch konstante Gewichtsunterschiede zwischen den Testgruppen nachgewiesen werden.

Zur spezifischen Quantifizierung des Sickness-Behaviors der Versuchstiere nach LPS-Exposition wurde jeweils das Offenfeldverhalten über 15 Minuten gemessen. Die bei 59 Mäusen erhobenen Parameter umfassten die zurückgelegte Distanz, die Aktivität als prozentualer Anteil an Bewegung bei Geschwindigkeiten über 2 cm/s und die Anzahl an Beschleunigungen, wobei eine Geschwindigkeitsänderung von >4 cm/s vorliegen musste. Zusätzlich wurden auch die Frequenz und die mittlere Dauer des vertikalen Aufrichtverhaltens ausgewertet. Tabelle 37 zeigt die zurückgelegten Entfernungen der Testgruppen im Expositionstest unterteilt nach Genotyp und Behandlung zu den sieben Testzeitpunkten.

Distanz [cm]	WT/WT		F77A/WT		F77A/F77A	
	NaCl (n=10)	LPS (n=10)	NaCl (n=10)	LPS (n=10)	NaCl (n=10)	LPS (n=9)
Tag	M ± SD	M ± SD	M ± SD	M ± SD	M ± SD	M ± SD
1	4867,7 ± 480,5	5418,9 ± 1343,5	5617,6 ± 678,4	4814,8 ± 1333,1	5026,3 ± 1107,4	5622,5 ± 1215,0
2	4176,4 ± 482,2	880,0 ± 996,7	4163,7 ± 1058,9	344,6 ± 447,7	4142,3 ± 1379,0	466,2 ± 428,8
3	4081,5 ± 824,4	1337,7 ± 983,5	4134,3 ± 894,9	605,4 ± 573,9	3883,7 ± 1583,6	597,4 ± 404,9
4	4135,0 ± 835,1	2111,0 ± 1222,8	4797,8 ± 1374,0	1727,6 ± 1347,2	3819,4 ± 1285,4	2701,7 ± 1504,5
5	4744,8 ± 859,9	4611,2 ± 2125,1	5949,0 ± 1266,4	2774,7 ± 1409,3	5048,0 ± 1730,5	3966,2 ± 1419,6
6	4790,1 ± 729,4	5055,7 ± 1894,2	4989,2 ± 1138,4	3336,0 ± 1553,8	4730,0 ± 1744,9	4617,6 ± 1391,5
10	5141,9 ± 917,0	5253,2 ± 1564,0	5999,0 ± 1034,3	4193,1 ± 1636,9	5576,0 ± 2730,9	4335,1 ± 868,1

Tabelle 37: Gesamtdistanzen der Testgruppen im Offenfeldtest. Gezeigt sind die durchschnittlichen Distanzen im Expositionstest als Mittelwerte (M) mit Standardabweichung (SD) unterteilt nach Genotyp (STAT1^{WT/WT}; STAT1^{F77A/WT}; STAT1^{F77A/F77A}) und Behandlung (NaCl versus LPS) zu den sieben Testzeitpunkten. Zusätzlich sind die Gruppenstärken (n) der Versuchsgruppen angegeben.

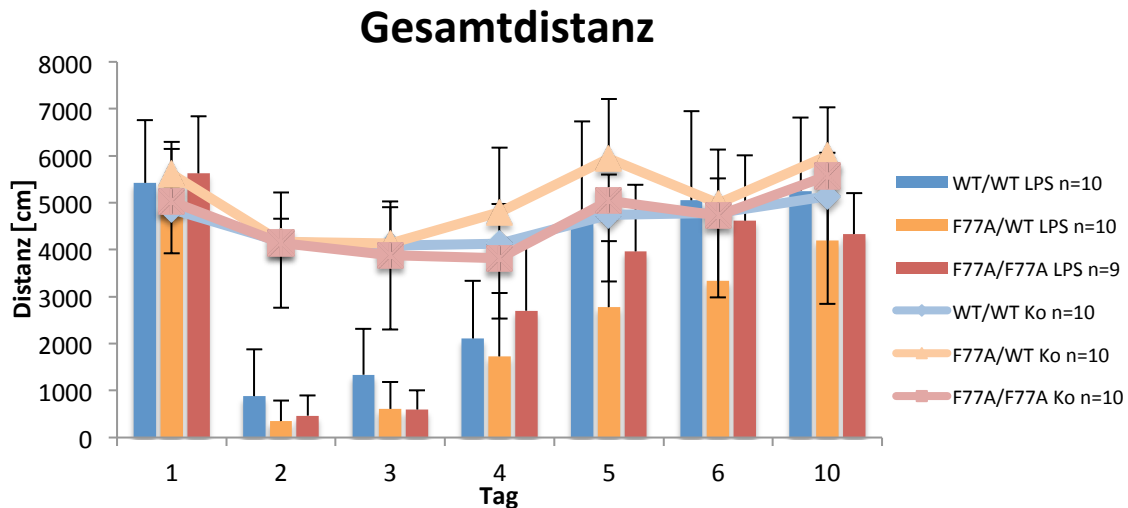


Abb. 37: Die LPS-Exposition führt bei STAT1^{F77A/F77A}-Mutation zu verkürzten Gesamtdistanzen im Offenfeld. Getestet wurden sechs Testgruppen mit drei unterschiedlichen Genotypen und zwei Behandlungsarten im Offenfeld. Im Liniendiagramm sind die Distanzen der 30 unbehandelten Mäuse und im Säulendiagramm die 29 LPS-infizierten Tiere gezeigt. Sowohl über die gesamte Testdauer, als auch im Vergleich der LPS-Gruppen an Tag 3 sind signifikante Differenzen festzustellen. Diese beruhen auf statistisch marginal kürzeren Entfernungen beider transgenen Gruppen nach der Injektion mit LPS.

Zur Prüfung der Frage, ob die zurückgelegten Distanzen im Offenfeldtest aus Abbildung 37 durch den Genotyp und die LPS-Behandlung beeinflusst wurden, folgte ein Vergleich der messwiederholten Distanzen mittels Varianzanalyse. Nach der statistischen Analyse veränderte sich die Gesamtdistanz signifikant über die sieben Testzeitpunkte ($F_{4,5/238,2}=113,91$; $p<0,001^{***}$). Die Infektion mit LPS sorgte bei den drei verglichenen Genotypen für eine unterschiedliche Änderung der Gesamtdistanz ($F_{9,0/238,2}=2,03$; $p=0,037^*$), wobei der Genotyp allein keinen Effekt ausübte ($F_{9,0/238,2}=0,82$; $p=0,60$). Die LPS-Behandlung senkte die Gesamtdistanzen deutlich ($F_{4,49/238,2}=35,69$; $p<0,001^{***}$). Die Betrachtung der Einflussfaktoren ohne Hinzunahme der Messwiederholung zeigte für die Interaktion von Behandlung und Genotyp eine marginal signifikante Auswirkung auf die Distanzen ($F_{2/53}=3,145$; $p=0,051$), wobei nur der Einfluss der Mutation die gemittelten Distanzen nicht signifikant änderte ($F_{2/53}=0,267$; $p=0,766$). Diese Resultate deuteten einen abweichenden, LPS-verursachten Effekt auf die motorische Aktivität und das Explorationsverhalten an.

Zur detaillierten Betrachtung der Differenzen folgte der Vergleich an den einzelnen Testtagen durch eine zweifache Varianzanalyse. Die statistischen Resultate dieses Vergleichs sind in Tabelle 38 beschrieben.

Distanz	Genotyp			Behandlung			Behandlung*Genotyp		
Tage	df	F	p	df	F	p	df	F	p
1	2;53	0,139	0,870	1;53	0,168	0,684	2;53	2,705	0,076
2	2;53	0,541	0,585	1;53	243,291	0,000	2;53	0,465	0,631
3	2;53	1,250	0,295	1;53	162,139	0,000	2;53	0,875	0,423
4	2;53	0,078	0,925	1;53	38,895	0,000	2;53	2,865	0,066
5	2;53	0,216	0,806	1;53	13,622	0,001	2;53	5,220	0,009
6	2;53	1,403	0,255	1;53	1,721	0,195	2;53	2,406	0,100
10	2;53	0,111	0,895	1;53	5,476	0,023	2;53	1,881	0,162

Tabelle 38: Statistische Ergebnisse der Einzelpunktvergleiche der Gesamtdistanzen. In der Tabelle sind die Resultate der zweifaktoriellen (Genotyp, Behandlung) ANOVA an allen Mess-tagen dargestellt. Im Speziellen sind die Freiheitsgrade (df), F- und p-Wert des statistischen Vergleichs gezeigt.

Im Einzelpunktvergleich in Tabelle 38 sind keine konstant abweichende Wirkungen der LPS-Behandlung auf die drei Genotypen abzulesen. In Analogie zu den Ergebnissen des Baseline-Tests rief der Genotyp $STAT1^{F77A/F77A}$ keine unterschiedlichen Distanzen im Offenfeldtest hervor. Dagegen reduzierte die LPS-Behandlung die motorische Aktivität bis zum Tag 6 signifikant.

An Tag 5 bewirkte die Injektion mit LPS beim Genotyp signifikant unterschiedliche Distanzen ($p=0,009^{***}$). Aufgrund dieses Ergebnisses schloss sich eine „single effects analysis“, d.h. eine Post-Hoc-Analyse der LPS-Subgruppen, an. Der einfaktorielle Varianzvergleich mit angeschlossenem Bonferroni-Paarvergleich zeigte für den Zeitpunkt 48 h (Tag 3) nach Injektion ($F_{2/28}=3,56$; $p=0,043$) marginal signifikant geringere Distanzen der transgenen Gruppen ($STAT1^{F77A/WT}$: $p=0,086$ und $STAT1^{F77A/F77A}$: $p=0,093$) verglichen mit der Referenzgruppe. Die an Tag 5 beschriebenen Differenzen zwischen den Testgruppen gehen auf geringere Distanzen der heterozygoten Gruppe im Vergleich mit der Wildtyp-Gruppe zurück. Zusammenfassend zeigten die homozygoten $STAT1^{F77A/F77A}$ -Tiere signifikant abweichenden Distanzen über die gesamte Testdauer mit marginal statistisch signifikant kürzeren Wegstrecken im Offenfeld am Tag 3.

Als weitere aussagekräftige Offenfeld-Messgröße wurde im Folgenden die prozentuale Aktivität der Testgruppen untersucht. Tabelle 39 zeigt den Aktivitätsanteil der 59 Test-mäuse während der Beobachtung im Alter von 8-9 Wochen über 7 Testzeitpunkte.

Aktivität [%]	WT/WT		F77A/WT		F77A/F77A	
	NaCl (n=10)	LPS (n=10)	NaCl (n=10)	LPS (n=10)	NaCl (n=10)	LPS (n=9)
Tag	M ± SD	M ± SD	M ± SD	M ± SD	M ± SD	M ± SD
1	26,2 ± 2,7	28,5 ± 5,1	30,1 ± 2,2	27,1 ± 6,7	28,6 ± 4,5	29,9 ± 5,1
2	22,1 ± 2,5	6,4 ± 8,5	22,2 ± 4,4	2,5 ± 3,3	22,1 ± 6,3	2,8 ± 2,5
3	20,6 ± 3,9	7,5 ± 5,1	22,1 ± 4,2	4,3 ± 4,1	20,4 ± 6,6	4,0 ± 2,7
4	21,5 ± 3,3	11,5 ± 5,5	24,3 ± 4,8	11,1 ± 8,4	20,2 ± 5,0	15,9 ± 8,4
5	22,6 ± 4,5	22,8 ± 8,3	28,6 ± 4,2	18,2 ± 8,7	27,7 ± 10,4	22,0 ± 5,0
6	25,6 ± 7,5	25,4 ± 7,9	26,5 ± 4,3	20,5 ± 11,2	23,8 ± 8,7	26,7 ± 8,3
10	24,9 ± 4,9	25,0 ± 5,7	28,7 ± 3,4	22,8 ± 7,8	26,6 ± 10,3	22,7 ± 4,2

Tabelle 39: Prozentuale Aktivität im Offenfeldtest. Dargestellt sind die Mittelwerte (M) mit Standardabweichung (SD) aufgeteilt nach Behandlung (NaCl versus LPS), Genotyp (STAT1^{WT/WT}, STAT1^{F77A/WT} und STAT1^{F77A/F77A}). Zusätzlich sind die Gruppengrößen (n) sowie die Testzeitpunkte angegeben.

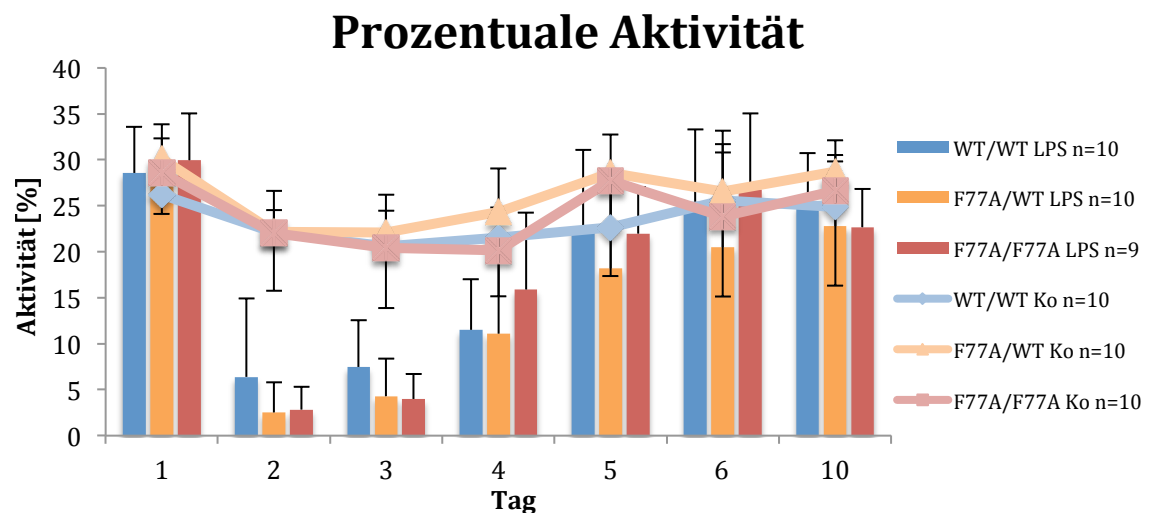


Abb. 38: Die prozentuale Aktivität im Offenfeldtest unterscheidet sich nicht zwischen den Versuchsgruppen. 20 STAT1^{WT/WT}, 20 STAT1^{F77A/WT} und 19 STAT1^{F77A/F77A} im Alter von 8 Wochen wurden zwei unterschiedlichen Behandlungsformen (NaCl versus LPS) über 10 Tage zugeführt. Im Liniendiagramm sind die Aktivitäten der Kontrollgruppen aufgetragen, das Säulendiagramm stellt den Aktivitätsanteil der LPS-Gruppen dar. Nach der initialen Verhaltensfassung an Tag 1 erfolgte eine Behandlung mit LPS (5 mg/kg Körpergewicht) oder einem äquivalenten Volumen 0,9% NaCl-Lösung. Im Offenfeldtest lassen sich keine statistisch differierenden Aktivitäten feststellen.

Zur Analyse des Aktivitätsanteils über die gesamte, messwiederholte Testdauer im Offenfeldtest kam erneut eine nach Greenhouse-Geisser korrigierte Varianzanalyse zum Einsatz. Aus Abbildung 38 ist eine deutliche Änderung der Aktivität über die Testdauer ablesbar ($F_{4,3/228,1}=117,76$; $p<0,001^{***}$). Alle Genotypen reagierten gleichsam auf die Stimulation mit LPS oder die Kontrollbehandlung ($F_{8,6/228,1}=1,49$; $p=0,157$) und auch

der Genotyp unterschied die Gruppen nicht in der prozentualen Aktivität zueinander ($F_{8,1/228,1}=1,03$; $p=0,420$). Im Gegensatz zum Genotyp reduzierte die LPS-Behandlung erwartungsgemäß die Aktivität im Offenfeld ($F_{4,3/228,1}=39,43$; $p<0,001^{***}$). Ebenso wies die Betrachtung der nichtmesswiederholten Haupteffekte lediglich auf eine Änderung der Aktivität im OFT durch die zwei Behandlungen hin ($F_{1/53}=37,7$; $p<0,001^{***}$). Die weitere Analyse der einzelnen Zeitpunkte zeigte keine klaren Effekte des Genotyps auf die Aktivität (s. Tabelle 40).

Aktivität	Genotyp			Behandlung			Behandlung*Genotyp		
Tage	df	F	p	df	F	p	df	F	p
1	2;53	0,860	0,429	1;53	0,040	0,843	2;53	1,869	0,164
2	2;53	0,855	0,431	1;53	186,480	0,000	2;53	0,913	0,408
3	2;53	0,752	0,476	1;53	172,802	0,000	2;53	1,351	0,268
4	2;53	0,330	0,721	1;53	32,786	0,000	2;53	2,631	0,081
5	2;53	0,436	0,649	1;53	7,924	0,007	2;53	2,640	0,081
6	2;53	0,348	0,707	1;53	0,259	0,613	2;53	1,485	0,236
10	2;53	0,156	0,856	1;53	3,679	0,060	2;53	1,117	0,335

Tabelle 40: Resultate des ANOVA-Vergleichs der prozentualen Aktivität. Die Tabelle stellt die Resultate der statistischen Vergleichstests aufgeteilt nach Genotyp ($STAT1^{WT/WT}$; $STAT1^{F77A/WT}$ und $STAT1^{F77A/F77A}$) und Behandlung (NaCl versus LPS) an den einzelnen Messzeitpunkten dar. Aufgelistet sind die Freiheitsgrade (df), F- und p-Werte der Varianzanalyse.

Aus Tabelle 40 ist ersichtlich, dass der Genotyp die Aktivität im LPS-Expositionstest nicht beeinflusste. An Tag 6 glichen sich die zurückgegangenen Aktivitäten der LPS-Gruppen dem Referenzgruppenniveau wieder an. Insgesamt wies der Messparameter der prozentualen Aktivität keine beträchtliche Trennschärfe zwischen den Versuchsgruppen nach.

Im sich anschließenden Abschnitt wurde der Frage nachgegangen, ob die $STAT1^{F77A}$ -Mutation die Beschleunigungsanzahl in der Offenfeldbeobachtung veränderte. Diese Messgröße ist in Tabelle 41 aufgeteilt nach Genotyp und Behandlungsgruppe dargestellt.

Beschleunigungen	WT/WT		F77A/WT		F77A/F77A	
	NaCl (n=10)	LPS (n=10)	NaCl (n=10)	LPS (n=10)	NaCl (n=10)	LPS (n=9)
Tag	M ± SD	M ± SD	M ± SD	M ± SD	M ± SD	M ± SD
1	1560,6 ± 181,7	1567,4 ± 242,0	2086,7 ± 609,0	1797,5 ± 581,1	1858,1 ± 470,2	1902,4 ± 427,4
2	1416,5 ± 237,9	329,4 ± 192,8	1451,2 ± 550,2	78,0 ± 80,2	1531,3 ± 575,7	280,4 ± 264,0
3	1305,8 ± 207,5	456,4 ± 250,7	1395,4 ± 459,8	194,9 ± 130,8	1217,0 ± 649,5	320,3 ± 227,2
4	1260,6 ± 344,3	588,8 ± 251,7	1440,3 ± 491,8	486,1 ± 236,3	1187,6 ± 713,9	756,0 ± 506,3
5	1407,2 ± 257,6	1027,6 ± 409,1	1677,6 ± 672,5	686,7 ± 368,6	1348,5 ± 618,0	1165,6 ± 500,6
6	1206,7 ± 304,7	1121,1 ± 368,3	1007,5 ± 352,8	1218,5 ± 792,4	1258,8 ± 658,0	1212,2 ± 660,1
10	1588,6 ± 227,5	1553,1 ± 450,4	2137,0 ± 562,9	1968,0 ± 862,9	1784,4 ± 676,3	1901,8 ± 502,8

Tabelle 41: Beschleunigungsanzahl im Offenfeldtest des LPS-Expositionstests. Die Tabelle zeigt die Anzahl der Beschleunigungen im Expositionstest unterteilt nach Genotyp ($STAT1^{WT/WT}$, $STAT1^{F77A/WT}$, $STAT1^{F77A/F77A}$) und Behandlungsgruppe (NaCl, LPS) als Mittelwerte (M) mit Standardabweichung (SD) und Gruppengröße (n).

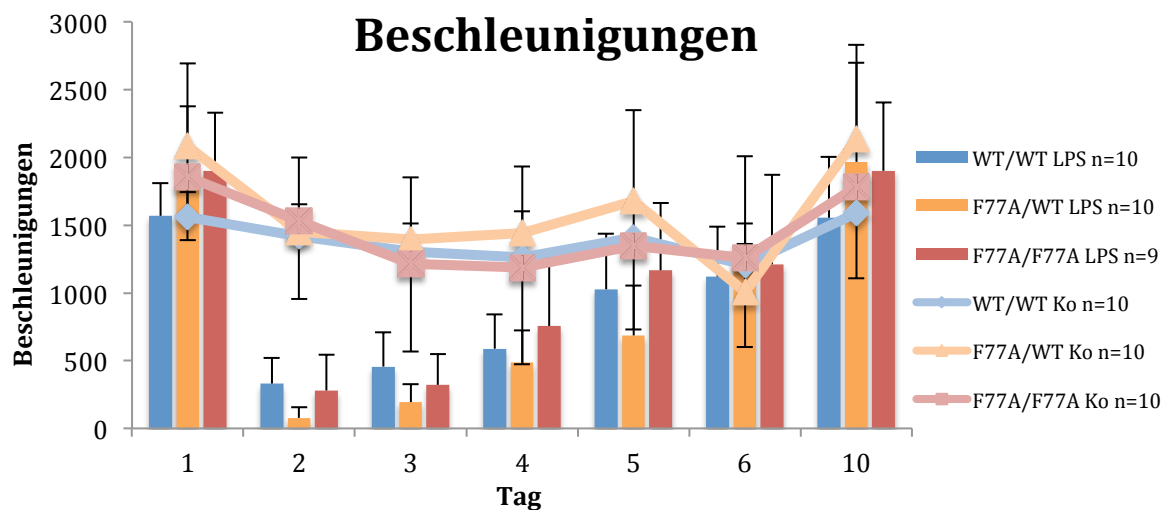


Abb. 39: Die Beschleunigungshäufigkeiten differieren nicht signifikant im LPS-Expositionstest. Im 15-minütigen Offenfeldtest wurde das Verhalten von 59 Versuchstieren aufgezeichnet. Die Abbildung zeigt im kombinierten Säulen- und Liniendiagramm die summierte Beschleunigungsanzahl der Versuchsgruppen, aufgeteilt nach Genotyp ($STAT1^{WT/WT}$; $STAT1^{F77A/WT}$; $STAT1^{F77A/F77A}$) und Behandlungsform (NaCl=Ko; LPS). Die Resultate des statistischen Vergleichs zeigten keine Genotyp-bedingten Differenzen zwischen den Gruppen.

Eine messwiederholte Varianzanalyse ergab, dass die Beschleunigungen sich über alle Messzeitpunkte signifikant änderten ($F_{3,90/206,9}=64,11$; $p<0,001$) und durch die LPS-Behandlung signifikant absanken ($F_{3,90/206,9}=2,29$; $p<0,001$). LPS verursachte allerdings bei allen Genotypen einen ähnlichen aktivitätsreduzierenden Effekt ($F_{7,81/206,9}=1,03$; $p=0,416$). Zwischen den drei getesteten Genotypen zeigten sich marginal statistisch signifikante Unterschiede im zeitlichen Verlauf der Häufigkeiten an Beschleunigungen

im Offenfeld ($F_{7,81/206,9}=1,92$; $p=0,061$). Dies traf auch für die Analyse der zeitlich-unabhängigen mittleren Beschleunigungen zu. Lediglich die Behandlung bewirkte signifikante Änderungen im Beschleunigungsverhalten im Offenfeldtest ($F_{1/53}=44,227$; $p<0,001^{***}$). In der genaueren Auswertung der Testergebnisse nach Testtag in Tabelle 42 zeigten sich ebenfalls keine eindeutig Genotyp-bedingten Unterschiede in der Beschleunigungsfrequenz.

Beschleunigungen	Genotyp			Behandlung			Behandlung*Genotyp		
Tage	df	F	p	Df	F	p	df	F	p
1	2;53	4,074	0,023	1;53	0,461	0,500	2;53	0,820	0,446
2	2;53	0,795	0,457	1;53	166,670	0,000	2;53	0,762	0,472
3	2;53	0,499	0,610	1;53	104,293	0,000	2;53	1,325	0,274
4	2;53	0,060	0,942	1;53	33,519	0,000	2;53	1,613	0,209
5	2;53	0,113	0,894	1;53	16,300	0,000	2;53	3,602	0,034
6	2;53	0,240	0,787	1;53	0,033	0,856	2;53	0,422	0,658
10	2;53	3,437	0,039	1;53	0,037	0,849	2;53	0,294	0,746

Tabelle 42: Statistische Resultate der Messgröße Beschleunigungen im ANOVA-Vergleich. Dargestellt sind die Ergebnisse der zweifaktoriellen ANOVA der einzelnen Messzeitpunkte als Anzahl der Freiheitsgrade (df), F- und p-Wert.

Nach Tabelle 42 suppressierte die LPS-Behandlung die Beschleunigungsanzahl der Versuchstiere bis zum Messzeitpunkt an Tag 6. Am ersten Testtag beschleunigten die heterozygoten Tiere signifikant häufiger, allerdings war diese Differenz an den folgenden Messpunkten nicht mehr nachweisbar. Der einfache ANOVA-Vergleich der LPS-Gruppen wies an Tag 5 eine marginale Signifikanz auf, die sich durch häufigeres Beschleunigen der $STAT1^{F77A/F77A}$ - gegenüber der heterozygoten Gruppe begründete. Zusammenfassend ließen sich keine eindeutigen und konstanten Abweichungen im Beschleunigungsverhalten durch die $STAT1^{F77A}$ -Mutation berichten.

Da die Gabe von Lipopolysaccharid angeständliches Verhalten im Versuchstier induzieren kann (Lacosta et al., 1999), wurde auch die lokomotions- und emotionalitätsassoziierte Messgröße des Aufrichtverhaltens in die Auswertung eingeschlossen. In Tabelle 43 ist die mittlere Rearing-Frequenz der Versuchsgruppen nach Unterteilung zwischen Genotyp und Behandlungsart dargestellt.

Anzahl der Rearings	WT/WT		F77A/WT		F77A/F77A	
	NaCl (n=10)	LPS (n=10)	NaCl (n=10)	LPS (n=10)	NaCl (n=10)	LPS (n=9)
Tag	M ± SD	M ± SD	M ± SD	M ± SD	M ± SD	M ± SD
1	100,2 ± 29,3	95,3 ± 24,5	75,8 ± 23,6	71,0 ± 33,3	63,5 ± 20,5	81,7 ± 32,9
2	91,5 ± 17,6	2,9 ± 5,6	79,9 ± 39,3	1,5 ± 4,1	70,0 ± 36,1	0,8 ± 1,7
3	77,1 ± 29,0	10,0 ± 13,7	84,1 ± 33,0	6,0 ± 9,3	68,4 ± 36,3	4,6 ± 11,1
4	86,2 ± 34,0	27,7 ± 18,3	91,2 ± 43,6	20,4 ± 27,8	64,5 ± 32,4	38,1 ± 27,0
5	92,2 ± 17,0	53,5 ± 20,0	99,7 ± 30,4	41,9 ± 46,2	79,4 ± 33,7	67,7 ± 39,7
6	91,3 ± 18,9	72,4 ± 24,6	88,4 ± 24,0	64,7 ± 53,8	70,0 ± 36,5	78,9 ± 36,9
10	92,7 ± 18,8	78,6 ± 22,8	95,2 ± 28,2	61,7 ± 48,9	70,9 ± 26,5	77,3 ± 43,0

Tabelle 43: Anzahl der Rearings im LPS-Expositionstest. Dargestellt ist die mittlere Aufrichtfrequenz (M) mit Standardabweichung (SD) im 15-minütigen Offenfeldtest bei insgesamt 59 Mäusen. Die Daten sind nach Genotyp ($\text{STAT1}^{\text{WT/WT}}$; $\text{STAT1}^{\text{F77A/WT}}$; $\text{STAT1}^{\text{F77A/F77A}}$) und Behandlung (NaCl versus LPS) getrennt aufgetragen.

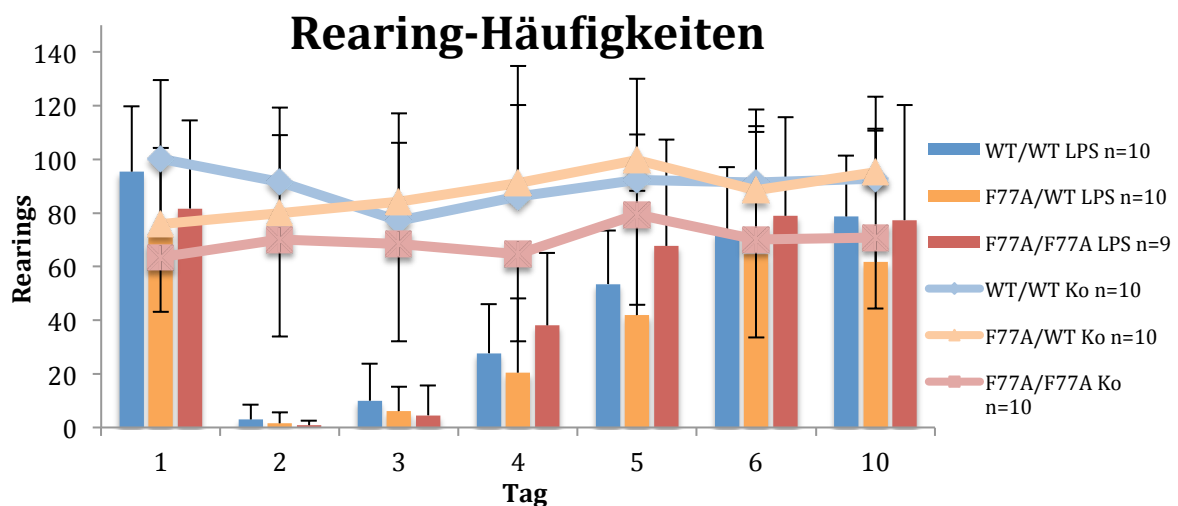


Abb. 40: Das Aufrichtverhalten im LPS-Expositionstest unterscheidet sich nicht zwischen den Versuchsgruppen. Die Abbildung zeigt die Effekte von Lipopolysaccharid (LPS) auf 59 Wildtyp-, heterozygote und homozygote Tiere im 15-minütigen Offenfeldtest über eine Gesamttestzeit von zehn Tagen. Die Versuchstiere wurden mit LPS (5 mg/kg Körpergewicht) oder einem äquivalenten Volumen einer physiologischen Kochsalzlösung nach einer Verhaltenstestung am ersten Testtag (Tag 1) behandelt. Die Graphik zeigt die mittlere Rearing-Frequenz im kombinierten Säulen- und Liniendiagramm, wobei die kontrollbehandelten Tiere als Linien und die LPS-behandelten Mäuse als Säulen dargestellt.

Neben einer signifikanten Änderung über die Testdauer ($F_{4,13/218,7}=40,04$; $p<0,001^{***}$) und einer eindeutigen Reduktion der Aufrichtaktivität durch die LPS-Infektion ($F_{4,13/218,7}=30,70$; $p<0,001^{***}$) erbrachte die Varianzanalyse der messwiederholten Rearing-Anzahl keine unterschiedliche Beeinflussung dieser Variablen durch den Genotyp ($F_{8,25/218,7}=1,06$; $p=0,395$) sowie der Kombination von Behandlung und Genotyp ($F_{8,05/218,7}=0,73$; $p=0,666$). Diese Resultate bestätigten sich auch für die Mittelwerte oh-

ne den Zeitfaktor. In diesem Abschnitt der Analyse übte einzig die LPS-Behandlung eine eindeutige Senkung der Rearing-Häufigkeiten innerhalb der Testgruppen aus ($F_{1/53}=40,5$; $p<0,001^{***}$). Die Ergebnisse der zweifachen ANOVA der einzelnen Messzeitpunkte beschreibt Tabelle 44.

Rearings	Genotyp			Behandlung			Behandlung*Genotyp		
Tage	df	F	p	df	F	p	df	F	p
1	2;53	5,294	0,008	1;53	0,153	0,697	2;53	1,113	0,336
2	2;53	1,252	0,294	1;53	167,535	0,000	2;53	0,840	0,437
3	2;53	0,656	0,523	1;53	115,878	0,000	2;53	0,445	0,643
4	2;53	0,172	0,842	1;53	39,812	0,000	2;53	2,551	0,088
5	2;53	0,037	0,963	1;53	17,961	0,000	2;53	2,435	0,097
6	2;53	0,241	0,786	1;53	1,571	0,216	2;53	1,262	0,292
10	2;53	0,610	0,547	1;53	2,549	0,116	2;53	1,783	0,178

Tabelle 44: Statistische Resultate der Varianzanalyse im Vergleich der Faktoren Behandlung und Genotyp. Die statistische Beeinflussung der Rearing-Anzahl durch die Faktoren Genotyp und Behandlung zu den einzelnen Testzeitpunkten ist in der obigen Tabelle abgebildet. Der Vergleich ist anhand der Freiheitsgrade (df), F- und p-Werte der Varianzanalyse dargestellt.

Die Resultate in Tabelle 44 zeigten, dass die Rearing-Häufigkeit der drei Genotypen im Offenfeldtest durch die Behandlungsform (NaCl versus LPS) in gleichartiger Weise beeinflusst wurde. Der Effekt der LPS-Behandlung bestand in einer Abnahme der Häufigkeit von Rearings bis 96 h (Tag 5) nach LPS-Applikation. Im Gegensatz zum Baseline-Verhaltenstest bewirkte die Mutation $STAT1^{F77A}$ ($F_{2/53}=5,3$; $p=0,008^{**}$) ein weniger häufiges Aufrichten der transgenen Gruppen ($STAT1^{F77A/WT}$: $p=0,022^{*}$; $STAT1^{F77A/F77A}$: $p=0,017^{*}$) im gesunden Zustand. An den folgenden Testtagen ist dieser Effekt allerdings nicht nachweisbar. Die Infektion führte in der Auswertung des Aufrichtverhaltens zu keinen Genotyp-bedingten Differenzen.

Eine spezifischere Analyse der Rearings ermöglichte die Auswertung der mittleren Dauer des Aufrichtverhaltens im Offenfeldtest. Als finaler Parameter des Expositionstests ist im Folgenden die mittlere Rearing-Dauer der Testtiere in Millisekunden während der 15-minütigen Testzeit in Tabelle 45 dargestellt.

Rearing-Dauer [ms]	WT/WT		F77A/WT		F77A/F77A	
	NaCl (n=10)	LPS (n=10)	NaCl (n=10)	LPS (n=10)	NaCl (n=10)	LPS (n=9)
Tag	M ± SD	M ± SD	M ± SD	M ± SD	M ± SD	M ± SD
1	644,9 ± 150,1	652,8 ± 162,1	731,0 ± 194,2	762,0 ± 142,5	781,3 ± 123,9	702,4 ± 121,9
2	616,3 ± 146,2	86,0 ± 140,7	654,4 ± 98,4	89,5 ± 149,3	763,2 ± 158,7	68,3 ± 141,7
3	576,6 ± 139,8	326,6 ± 294,5	627,5 ± 125,8	242,3 ± 280,0	664,9 ± 159,6	171,2 ± 233,7
4	587,6 ± 145,0	486,3 ± 180,3	528,1 ± 119,1	513,3 ± 407,8	632,6 ± 130,0	672,9 ± 104,1
5	505,1 ± 116,5	430,6 ± 157,7	525,7 ± 121,8	600,2 ± 254,6	629,9 ± 138,5	629,3 ± 116,1
6	526,1 ± 142,4	481,2 ± 119,3	544,5 ± 145,9	646,0 ± 170,8	636,2 ± 175,7	636,2 ± 86,5
10	488,7 ± 71,7	568,3 ± 106,8	652,2 ± 291,9	652,2 ± 291,9	583,2 ± 117,9	609,4 ± 187,6

Tabelle 45: Durchschnittliche Dauer des Aufrichtverhaltens im Expositionstest. In der Tabelle sind die mittleren Aufrichtlängen [ms] als Mittelwerte (M) mit Standardabweichungen (SD), Gruppenstärke (n) an sieben Testzeitpunkten über eine zehntägige Versuchsdauer aufgetragen.

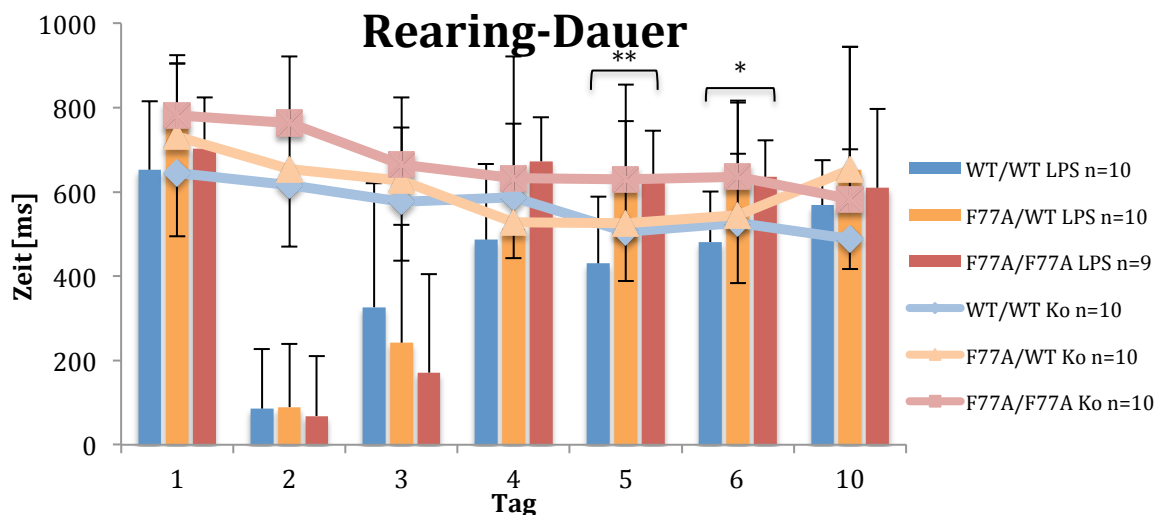


Abb. 41: Die STAT1^{F77A/F77A}-Mäuse zeigen in einer späten Phase des Expositionstests verlängertes Aufrichtverhalten. Der Expositionstest überprüfte die Folgen einer intraperitonealen LPS-Injektion auf das Verhalten im Offenfeld. Hierbei wurden drei unterschiedliche Genotypen (STAT1^{WT/WT}; STAT1^{F77A/WT}; STAT1^{F77A/F77A}) zweier Behandlungsformen (NaCl versus LPS) unterzogen. Im kombinierten Linien- und Säulendiagramm sind die mittleren Rearing-Zeiten aufgeteilt nach den sechs Versuchsgruppen an sieben Messzeitpunkten aufgetragen. Die homozygote STAT1^{F77A/F77A}-Gruppe richtete sich an Tag 5 und 6, respektive 96 und 120 h nach der Infektion, statistisch signifikant länger auf (gekennzeichnet als ** und *). Das Signifikanzniveau der heterozygoten Tiere wurde zur besseren Übersichtlichkeit nicht dargestellt.

Eine Beeinflussung der mittleren Aufrichtdauer im Offenfeld durch den STAT1-Signalweg unter LPS-Gabe wurde durch eine dreifaktorielle ANOVA mit Messwiederholung auf einem Faktor überprüft. Nach Abbildung 41 stellten hierbei sowohl die Testzeit ($F_{4,1/219,7}=29,30$; $p<0,001$), als auch die Behandlung ($F_{4,15/219,7}=39,00$; $p<0,001$)

für die Länge der Rearings signifikante Einflussgrößen dar. Zwischen den Testzeitpunkten veränderten die unterschiedlichen Genotypen ($STAT1^{WT/WT}$; $STAT1^{F77A/WT}$; $STAT1^{F77A/F77A}$) ihr Verhalten nicht signifikant ($F_{8,30/219,7}=1,40$; $p=0,195$). Dies traf auch im Vergleich der Genotypen auf beide Behandlungsformen zu ($F_{8,30/219,7}=1,16$; $p=0,322$). Allerdings wies die Betrachtung der nicht-messwiederholten Faktoren auf einen deutlichen Effekt des Genotyps in der summierten Betrachtung aller Zeitpunkte hin ($F_{2/53}=4,246$; $p=0,019$), wobei dieser durch die Hinzunahme des Faktors Behandlung verschwand ($F_{2/53}=0,732$; $p=0,486$). Um diese Befunde genauer einzuordnen, folgte die Betrachtung der einzelnen Messpunkte.

Neben einem deutlichen Abfall der Aktivität nach der intraperitonealen LPS-Injektion zeigte die $STAT1^{F77A/F77A}$ -Gruppe ab Tag 4 längere Aufrichtzeiten. Diese Feststellung ist auch für die heterozygoten Tiere zutreffend. In der Betrachtung der Testzeitpunkte in Tabelle 46 wird dieser Effekt deutlich.

Rearing-Dauer Tage	Genotyp			Behandlung			Behandlung*Genotyp		
	df	F	p	df	F	p	df	F	P
1	2;53	2,620	0,082	1;53	0,114	0,737	2;53	0,705	0,499
2	2;53	1,067	0,351	1;53	265,757	0,000	2;53	1,842	0,168
3	2;53	0,117	0,889	1;53	44,735	0,000	2;53	1,559	0,220
4	2;53	2,261	0,114	1;53	0,213	0,647	2;53	0,563	0,573
5	2;53	5,093	0,009	1;53	0,000	0,996	2;53	1,095	0,342
6	2;53	4,344	0,018	1;53	0,252	0,618	2;53	1,350	0,268
10	2;53	2,687	0,077	1;53	1,016	0,318	2;53	0,225	0,799

Tabelle 46: Resultate der zweifaktorielle ANOVA im Parameter Rearing-Dauer. Die Tabelle zeigt die Ergebnisse des statistischen Vergleichs jedes Messzeitpunkts des LPS-Expositionstests. Im Einzelnen sind die Freiheitsgrade (df), F-Werte (F) und p-Werte (p) der Faktoren Genotyp, Behandlung sowie die Kombination von Genotyp und Behandlung aufgetragen.

Die zeitliche Länge der Rearings unterschied sich nach Tabelle 46 am Tag 5 und 6 statistisch signifikant zwischen den drei Versuchsgruppen. Der multiple Paarvergleich ergab ein deutlich längeres Aufrichten der homozygoten transgenen Gruppe (t_5 : $p=0,008^{**}$; t_6 : $p=0,018^*$). Interessanterweise traten diese Verhaltensunterschiede zu einem Zeitpunkt auf, an dem durch die Behandlung keine Beeinflussung der Rearing-Zeiten mehr nachweisbar war. Die Injektion mit LPS reduzierte die Rearing-Dauer le-

diglich bis 48 h nach der Applikation (Tag 3). Für die übrigen Faktoren lagen keine Differenzen in den Vergleichstest vor (vgl. Tabelle 46).

Im Expositionstest kehrte der beobachtete Aktivitätsverlust als Ausdruck eines Sickness-Behavior zwischen dem Tag 4-6, entsprechend bis zu 120 h nach der LPS-Injektion, auf Referenzgruppenniveau zurück. Weitere Zeichen des Sickness-Behavior wie struppiger Fellzustand, fehlendes Putzen, Muskelzittern und eine eingeschränkte Grundaktivität konnten ebenfalls beobachtet werden. Die klinische Beobachtung des Krankheitsverhaltens korrelierte soweit eruierbar mit den objektiven Messgrößen des Offenfeldtests, sodass auch hier eine stärkere Erkrankungssymptomatik durch die LPS-Infektion in den STAT1^{F77A/F77A}-Mäusen erkannt wurde.

Die statistische Analyse der Versuchsgruppen verdeutlichte signifikante Unterschiede in den zurückgelegten Distanzen im Offenfeldtest. Die Streckenlängen der Testtiere zeigten sich in der Betrachtung aller Messzeitpunkte über die gesamte Dauer durch die Behandlung und den Genotyp signifikant beeinflusst. Daneben wies auch der Vergleich der behandelten STAT1^{F77A/F77A}-Tiere mit der STAT1^{WT/WT}-Gruppe marginal signifikant geringere Strecken der transgenen Gruppe auf. Sowohl in der klinischen Beobachtung als auch in weiteren Offenfeldparametern bestätigte sich das höhere Aktivitätsniveau der Referenztiere. In einer späteren Phase des Expositionstests (ab Tag 4) war die Zeitspanne des Aufrichtverhaltens der STAT1^{F77A/F77A}-Gruppe deutlich verlängert. Auch in weiteren Parametern (Distanzen, Aktivität, Rearing-Anzahl) zeigten sich vereinzelt Hinweise für eine beschleunigte Erholung der transgenen Gruppe.

Im Gegensatz zu den Versuchsgruppen des Baseline-Tests konnte in der Analyse der Offenfeldparameter der kontrollbehandelten Mäuse des Expositionstests kein ausgeprägter Aktivitätsrückgang festgestellt werden. Die kurzfristige repetitive Testexposition bewirkte zwar eine anfängliche Verminderung der Mittelwerte, am letzten Testzeitpunkt nach 10 Tagen erreichten alle Gruppen allerdings wieder das Ausgangsniveau.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen von kooperativem DNA-Bindeverhalten des Transkriptionsfaktors STAT1 auf das depressionsassoziierte Verhalten und den Ablauf einer LPS-induzierten Entzündungsreaktion in verhaltensbiologischen Experimenten mittels einer transgenen Knockin-Mauslinie untersucht. Erstmals überhaupt wird durch diese Experimente die Bedeutung von kooperativer DNA-Bindung in einem organismischen Kontext fassbar. Die in dieser Studie durchgeführten Verhaltensexperimente zeigten gänzlich unerwartete Befunde und weisen der STAT1-vermittelten Interferon- γ -Antwort entgegen der initialen Annahme anti-depressiogene Effekte zu. Diese Beobachtung stand im deutlichen Widerspruch zu der anfänglichen Vermutung, dass sämtliche Interferone für Entstehung und Aufrechterhaltung von depressiven Verhaltensmustern verantwortlich sind.

In Vorarbeiten zu der vorliegenden Verhaltensstudie wurde deshalb eine transgene Knockin-Maus mit einer Punktmutation durch Austausch eines kritischen Phenylalanins in Position 77 gegen Alanin hergestellt. Diese STAT1^{F77A/F77A}-exprimierenden Knockin-Mäuse sind unter pathogen-freien Haltungsbedingungen voll lebensfähig und zeigen keinen erkennbar abweichenden Phänotyp. Versuche zur Charakterisierung dieser Mauslinie bei inflammatorischen Erkrankungen sind gegenwärtig im Gange und mit einer Veröffentlichung wird in Kürze gerechnet.

Durch die Substitution eines kritischen Phenylalaninrestes in Position 77 wird eine STAT1-Mutante erhalten, die zwar Homodimere bilden kann, aber bei Verlust der kooperativen DNA-Bindung nicht mehr zur Tetramerisierung auf DNA befähigt ist (Abb. 10A). Humane mit dem Plasmid pSTAT1-F77A transfizierte Zellen zeigen nach Interferon-Stimulation ein höheres Phosphorylierungsniveau und eine verlängerte nukleäre Akkumulationsphase von STAT1, jedoch auf Interferon- γ -responsiven Zielgenen eine inhibierte Transkriptionsaktivierung gegenüber Zellen, die das Wildtyp-Molekül exprimieren (Meyer et al., 2004).

Diese bereits unter Zellkulturbedingungen beschriebenen Effekte eines defizienten kooperativen DNA-Bindeverhaltens konnten in dieser Arbeit auch in Fibroblasten aus der transgenen Mauslinie eindrucksvoll nachgewiesen werden. Hierzu bestätigten eigene RT-PCR-Ergebnisse, dass kooperative DNA-Bindung *in vivo* für Genaktivierung im Interferon- γ -Weg notwendig ist. Interessanterweise zeigten nämlich kardiale Fibroblas-

ten keine Interferon- γ -induzierbare Responsivität für das *mig*-Gen, das als einziges einer Vielzahl von Interferon- γ -abhängigen Zielgenen in dieser Arbeit getestet wurde (Abb. 10B). In Extrakten immortalisierter Fibroblasten aus der homozygoten STAT1^{F77A/F77A}-Mauslinie wurde nach Stimulation mit murinem Interferon- γ keine Aktivierung des STAT1-regulierten *mig*-Gens festgestellt, während Zellen aus Wildtyp-Tieren eine deutliche Interferon- γ -Stimulierbarkeit aufweisen.

Die Auswirkung der aminoterminalen Punktmutation auf die Steuerung der Immunantwort wird gegenwärtig in weiteren Versuchsreihen tierexperimentell untersucht. In dieser Studie wurden die ethologischen Konsequenzen einer defizienten Interferon- γ -Antwort in den Fokus genommen.

Aus einer Vielzahl klinischer Studien ist gut belegt, dass die therapeutische Gabe von Typ-I-Interferonen schwere Depressionen auslöst (Dowlati et al., 2010). Über mögliche intrazellulären Mediatoren der Depressionsauslösung durch Interferone ist jedoch bislang nur wenig bekannt. Dieses erscheint besonders deshalb verwunderlich, weil die immunmodulierenden Interferon-Effekte vergleichsweise intensiv beforscht wurden und die bekannten Interferoneffekte weitgehend über Mitglieder der Protein-Familie der STAT-Transkriptionsfaktoren verlaufen. Gegenüber den peripher immunmodulierenden Effekten wurde den zentralen depressiogenen Wirkungen von Interferonen dagegen weitaus weniger Aufmerksamkeit zuteil. Einen weiteren Hinweis darauf, dass STAT-Proteine an komplexen Verhaltensmustern, wie denen einer entzündungsassoziierten Anorexie im Rahmen eines Sickness-Behaviours beteiligt sein könnten, lieferte die ebenfalls erst kürzlich publizierte Arbeit von Yamawaki und Mitarbeitern. Darin berichten die Autoren, dass eine Lipopolysaccharid-induzierte Anorexie mit einer Tyrosin-Phosphorylierung von STAT3 im Hypothalamus einhergeht, wobei das Adaptormolekül MyD88 dabei eine zentrale Rolle spielt (Yamawaki et al., 2010). Schon früher war das durch Zytokine induzierbare Syndrom des Sickness-Behaviors mit depressionsähnlichen Verhaltensänderungen beschrieben worden (Hart, 1988; Maes et al., 1993a). Zur genaueren Untersuchung des Sickness-Behaviors wurde in Tiermodellen depressionsähnliches Verhalten durch pharmakologische Stimulation mit Interferonen, Interleukinen oder TNF- α ausgelöst. Für das Studium einzelner Komponenten von Signalwegen bei der Zytokin-induzierten Depression wurden Knockout- oder transgenen Tiermodellen eingesetzt. Dabei konnten sowohl antidepressive (Pechnick et al., 2004; Basso et al., 2009) wie auch depressive Verhaltensmuster beobachtet werden (Wu et al., 2010).

Eine pathogenetische Beteiligung der Interferone im Konzept der Zytokin-induzierten ist durch die klinische Bedeutung von Interferon- α als depressionsauslösendes Medikament (Schaefer et al., 2002) sowie von Interferon- γ als regelmäßig depressionsassoziierter Inflammationsmarker (Maes et al., 2009) und potenter Mikroglia- (Hashioka et al., 2007; Moran et al., 2007) und IDO-Aktivator (Dunn et al., 2005) hochwahrscheinlich. Da die intrazellulären Effekte der Interferone entscheidend durch den Transkriptionsfaktor STAT1 vermittelt werden, sollte die Erforschung von Verhaltensänderungen durch eine mutierte STAT1-Variante mit defizienter kooperativer DNA-Bindung neue Erkenntnisse zur Bedeutung von Interferonen bei zerebralen Prozessen gewinnen können.

Zur Bestimmung des STAT1-Genotyps der transgenen Tiere wurde in dieser Arbeit eine Polymerasekettenreaktion mit nachfolgendem Restriktionsverdau eingesetzt. Diese Typisierungsart ist ein langjährig benutztes, validiertes und verlässliches Verfahren (Ren et al., 2001, Hao et al., 2004). Bei der Verwendung von Ohrlochstanzen als DNA-Quelle wird knorpeliges Gewebe verwendet, welches in manchen Fällen keine ausreichende DNA-Konzentration aufweist. Deshalb liegt die Erfolgsquote einer Genotypisierung mit dieser Methode bei ungefähr 90-100%. Testmäuse ohne eindeutiges Ergebnis in der Genotypisierung wurden nicht in unsere Verhaltensexperimente eingeschlossen. Eine systematische Fehlerquelle kann demnach in der verwendeten Methode nicht vermutet werden. Auch die Kontrolle der DNA-Konzentrationen der eingesetzten PCR-Proben zeigt in einer photometrischen Bestimmung zufriedenstellende Konzentrationswerte des Amplifikats.

Die verhaltensbiologischen Konsequenzen einer Deletion des kompletten Interferon- γ -Signalweges durch selektive Rezeptor-Ablation war bereits Gegenstand einiger Publikationen (O'Connor et al., 2009a; Litteljohn et al., 2010; Saito et al., 2010). Diese Veröffentlichungen lassen sich aufgrund der Benutzung ähnlicher Verhaltenstests mit den vorliegenden Ergebnissen gut vergleichen. Allerdings ist bei der oligomerisierungsdefekten STAT1^{F77A/F77A}-Variante aufgrund der dualen Funktion von STAT1 für Interferon- α und - γ ein Einfluss in beiden Signalwegen grundsätzlich möglich, wobei die beschriebenen zytobiologischen Erkenntnisse am ehesten Veränderung im Interferon- γ -Weg erwarten ließen.

Im Baseline-Test wurden die Verhaltensänderungen der STAT1^{F77A/F77A}-Mauslinie im nicht immunstimulierten, gesunden Zustand evaluiert. Hierzu wurde mithilfe einer ex-

perimentellen Testbatterie eine Kontrollgruppe bestehend aus C57BL/6-Wildtyp-Tieren mit einer heterozygoten und einer homozygot transgenen Testgruppe verglichen. Der unterschiedliche Genotyp bildete bei den unbehandelten Versuchstieren das einzige Unterscheidungsmerkmal zwischen den Gruppen und sollte deshalb für die erhobenen Verhaltensdifferenzen verantwortlich sein.

Die in dieser Arbeit untersuchte transgene Mauslinie $STAT1^{F77A/F77A}$ zeigt während der dreimonatigen Baseline-Testung nach Ausschluss der zugekauften Tiere in der statistischen Auswertung keine Gewichtsunterschiede. Allerdings kann über die Testdauer eine Tendenz zu einem geringeren Gewichtszuwachs der Kontrolltiere beobachtet werden (s. Abb 11). Dieser Effekt könnte grundsätzlich mit dem dysfunktionalen IFN- γ -Signalweg einhergehen, da Kwant und Sakic bei einer hyperphysiologischen Ansteuerung von Interferon- γ -responsiven Zielgenen eine Gewichtsreduktion der Testtiere beobachteten (Kwant und Sakic, 2004). Basso et al. zeigten ein gesteigertes Fressverhalten bei P2X-Rezeptor-Knockout-Tieren, sodass die Autoren von einem Einfluss des Zytokins Interleukin-1 auf die Regulation der Nahrungsaufnahme und des Körpergewichts ausgehen (Basso et al., 2009). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass unter Umständen eine dysfunktionale STAT1-Signaltransduktion mit Auswirkungen auf das Fressverhalten assoziiert ist. Eine bei einzelnen Tieren des Genotyps $STAT1^{F77A/F77A}$ und $STAT1^{F77A/WT}$ durchgeführte Langzeitbeobachtung der Gewichtsentwicklung ergab jedoch keine augenscheinlichen Auffälligkeiten. Dieser Zusammenhang ließe sich aber nur durch eine genauere und probandenstarke Dokumentation der Körpergewichtsentwicklung über einen ausgedehnten Zeitraum überprüfen.

Der durchgeführte Rotarod-Test ergab keine signifikanten Unterschiede in der durchschnittlichen Aufenthaltsdauer auf der Testapparatur, der Versuchsanzahl sowie der benötigten Gesamtzeit bis zum Zielwert. Die Ergebnisse weisen folglich auf ähnliche motorische Leistungs- und Lernfähigkeiten sowie gleiche Koordinationsmöglichkeiten der transgenen $STAT1^{F77A/F77A}$ -Mäuse hin. Trotzdem gestaltet sich die Interpretation der Ergebnisse des Rotarod-Tests aufgrund der großen Streumaße der Stichproben als schwierig. Potentielle Unterschiede könnten aufgrund dieser Problematik in der statistischen Analyse nicht erfasst worden sein. Nach der beschriebenen Analyse liegen allerdings keine Hinweise für motorische und koordinative Defizite der $STAT1^{F77A}$ -Tiere vor.

Auch die statistischen Ergebnisse des Offenfeldtests wiesen keine eindeutigen Unterschiede zwischen den Genotypen nach. Sowohl die lokomotorischen, als auch die angstassoziierten Parameter zeigten keine klaren Verhaltensabweichungen. Allerdings lassen sich in emotionalitätsbezogenen Parametern (Rearing-Anzahl, Rearing-Dauer, Distanz und Aktivität im ersten Intervall) im Vergleich der Genotypen durchgängig Tendenzen in der Rangfolge der Mittelwerte beschreiben, die am letzten Messzeitpunkt in der Rearing-Dauer sogar Signifikanzniveau erreichen (s. Abb 19). In den restlichen Parametern können die Unterschiede oftmals wegen relativ großer Streuungen der Stichprobenwerte nicht als signifikant eingestuft werden.

Die Abnahme der durchschnittlichen Messwerte der OFT-Parameter am zweiten und dritten Testzeitpunkt im Vergleich zum Ausgangswert erfolgte konstant und unabhängig vom getesteten Genotyp. Dieser Aktivitätsrückgang ist bei repetitiver Exposition eines Versuchstieres in identischen Testsituationen ein bekannter und gut studierter Effekt (Dixon et al., 1968). Die Versuchstiere kennen bereits die Testsituation und den Versuchsaufbau, sodass ihr Explorationstrieb nachlässt. Dieser Aktivitätsrückgang kann deshalb als Habituationseffekt interpretiert werden.

Die in einigen Studien mit Interferon- γ -defizienten Mäusen beschriebenen lokomotorischen und angstassoziierten Verhaltensänderungen (Kustova et al., 1998; Littelljohn et al., 2009; Littelljohn et al., 2010) konnten in der Offenfeldtestkomponente des Baseline-Versuchs nicht nachvollzogen werden. Diese Publikationen berichten über eine reduzierte explorative und motorische Aktivität im Heimkäfig und Offenfeldtest. Am ehesten entsprechen die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Ergebnisse den Erkenntnissen von Saito und Kollegen, die über eine fehlende Beeinflussung der Offenfeldaktivität durch den Interferon- γ -Genotyp berichten (Saito et al., 2010). Diese Forschergruppe publiziert allerdings eine gesteigerte Ängstlichkeit, die sie durch eine reduzierte Aufenthaltszeit in den offenen Armen des Elevated-Plus-Maze-Tests ermitteln. Da der eingesetzte Test in der vorliegenden Untersuchung nicht zur Verfügung stand, entfällt diese Vergleichsmöglichkeit. Möglicherweise hätte ein durchgeführter EPM-Test ein gesteigertes ängstliches Verhalten der STAT1^{F77A}-Mäuse nachweisen können. Lediglich das tendenziell weniger häufige und in der Dauer verlängerte Aufrichtverhalten könnte einen anxiogenen Effekt der Mutation andeuten, wobei die Aktivität im aversiv empfundenen Zentrum keinen Unterschied zum Wildtyp-Verhalten erfasst. Letzterer Messparameter gilt in der Literatur als wichtiger Marker für angstassoziiertes Verhalten (Prut und Belzung, 2003). Die externe Applikation der Zytokine Interferon- α und - γ ruft,

wie bereits erwähnt, keine Verhaltensmodifikation im Offenfeldtest im Sinne eines Sickness-Behavior hervor (Makino et al., 1998; Makino et al., 2000), sodass in diesem Punkt eine Ähnlichkeit zum erhobenen Verhalten der STAT1^{F77A}-Tiere besteht.

Einige Kritikpunkte könnten jedoch die Aussagekraft sowie die Vergleichbarkeit des Offenfeldtests einschränken. Der Offenfeldtest wird oftmals in der Literatur wegen fehlender Standardisierung in den Punkten Aufbau und Erfassungsparameter kritisiert. In der Forschung bleibt häufig unberücksichtigt, dass der Offenfeldtest keinesfalls nur die lokomotorische Aktivität eines Testtieres, sondern auch eine emotionale Reaktion auf eine neue Umgebung beschreibt (Walsh und Cummins, 1976; Stanford, 2006). Fehlende Standardisierung kann ein Testergebnis beeinflussen und häufig bestehen große Unterschiede zwischen den Laboren bei Form, Beleuchtung und Material der Testapparatur. Auch das Testalter der Tiere, Beginn und Dauer der Beobachtung, Ort der Platzierung der Tiere und die Anwesenheit von Objekten sind im Offenfeldtest nicht standardisiert (Stanford, 2006). Eine interne Testverfälschung sollte sich allerdings durch die Nutzung einer großen Referenzgruppe, die unter gleichen Bedingungen wie die transgenen Tiere aufgezogen und gehalten wurde, nicht ergeben. Auch die zeitgleiche Testung der Kontrollgruppen mit den beiden transgenen Testgruppen in gleicher Umgebung stärkt die Aussagefähigkeit des Offenfeldtests, der wie berichtet keine profoundly abweichenden Verhaltensmuster der STAT1^{F77A}-Mauslinie nachgewiesen hat.

Der soziale Interaktionstest zeigt im Vergleich der beiden Gruppen mit transgenen STAT1^{F77A}-Partnern signifikante Differenzen bei der ersten Testexposition im Alter von 8 Wochen. Die Paare aus homozygot transgenen und Wildtyp-Partnern suchen in der initialen Verhaltensfassung häufiger den sozialen Kontakt als die Paare von heterozygoten- und Wildtyp-Tieren (s. Abb. 26). Zu den übrigen Messzeitpunkten und in der Dauer der sozialen Kontakte sind keine statistisch signifikanten Unterschiede nachweisbar (s. Abb. 26 und 27). Im Vergleich mit den Literaturwerten (s. Tab. 25 und 27) ist eine reduzierte Anzahl sozialer Kontakte der transgenen Mauslinie festzustellen, welche sich allerdings über einen längeren Zeitraum im Vergleich zu Wildtyp-/Wildtyp-Kontrollen erstrecken (Matsuo et al., 2010).

Da Sickness-Behavior und Zytokin-induzierte Depression zu einer Reduktion der sozialen Interaktion führen, könnte im Umkehrschluss ein Defekt im Interferon-Signalweg durch den Genotyp STAT1^{F77A} mit einer erhöhten sozialen Interaktion einhergehen. Die verlängerte Gesamtdauer der sozialen Kontakte im Literaturvergleich spricht für eine

solche Interpretation. Die gemessene reduzierte Interaktionsfrequenz im Vergleich mit den publizierten Daten könnte hingegen auf ein depressionsähnliches Verhalten im sozialen Interaktionstest der Mauslinie $STAT1^{F77A}$ hindeuten, da eine Depression häufig mit einem sozialen Rückzugsverhalten einhergeht. Aufgrund des depressionsassoziierten Phänotyps im FST der untersuchten Mauslinie und der Berichte von Saito und Mitarbeitern sowie Litteljohn und Kollegen über ein gesteigertes angstassoziiertes Verhalten von IFN- γ -Knockout-Mäusen scheint eine Deutung der Resultate des SIT im Sinne eines verstärkten depressionsähnlichen Verhaltens plausibler.

Der durchgeführte Vergleich in der sozialen Interaktion zwischen den beiden transgenen Gruppen ($STAT1^{F77A/WT}$ und $STAT1^{F77A/F77A}$) wies nach Abbildung 25 mehr Interaktionen der Gruppe mit einem homozygoten $STAT1^{F77A/F77A}$ -Partner. Jedoch zeigten sich die Unterschiede nicht konstant über alle Messzeitpunkte und lediglich in der Interaktionshäufigkeit, sodass nicht von einer ausgeprägten Verhaltensdifferenz ausgegangen werden kann.

Insgesamt erscheint der Vergleich mit den Publikationsdaten nur eingeschränkt aussagekräftig, da die entnommenen Daten auf eine 30-minütige Testzeit extrapoliert werden mussten und Matsuo et al. durchschnittlich 15 Wochen alte Mäuse einsetzten, wohingegen die Versuchstiere der vorliegenden Arbeit eine dreimalige Testexposition im Alter von 8-16 Wochen erfuhren. Zusätzlich sind ergebnisbeeinflussende Bedingungen der Vergleichsarbeit, wie z.B. die Beleuchtung der Arena, unzureichend standardisiert. Eine weitere Einschränkung der Aussagefähigkeit der Analyse, ist der erzwungene Verzicht auf die motorischen Parameter im SIT. Normalerweise werden im sozialen Interaktionstest sowohl die Interaktionsparameter als auch die motorischen Parameter der Testtiere erhoben und analysiert. Aufgrund der Störanfälligkeit der optischen Erkennungsmethode gestaltete sich die Erhebung von validen lokomotorischen Parametern als nahezu unmöglich, sodass darauf verzichtet wurde. Diese Problematik scheint in einigen Laboren zu bestehen, weshalb Overstreet bereits eine Tendenz zur Aufgabe dieser Einflussgröße feststellte (Overstreet, 2007). Allerdings ergibt die Auswertung des Offenfeldtests im Baseline-Versuch keine Hinweise auf eine abweichende motorische Aktivität der $STAT1^{F77A}$ -Tiere, weshalb im SIT bei diesen Parametern vermutlich ebenfalls keine signifikanten Differenzen zu erwarten sind. Eine genauere Analyse der Auswirkung eines Verlusts der kooperativen DNA-Bindung von STAT1 auf die soziale Interaktionsaktivität kann somit nur durch eine erneute Verhaltensbeobachtung inklusive eines Vergleichs mit Wildtyp/Wildtyp-Interaktion erfolgen.

Im depressionsassoziierten Forced-Swim-Test zeigt die Versuchsgruppe mit Mäusen des Genotyps $STAT1^{F77A/F77A}$ ein verlängertes Floating sowie deutlich kürzere aktive Swimming- und Struggling-Episoden (s. Abb. 28, 29 und 30). Auch die klassische Auswertungsmethode der letzten vier Testminuten und die getrennte Analyse der ersten und zweiten Testhälfte erbringt ebenfalls eine Bestätigung des eindeutig depressionsähnlichen Phänotyps der $STAT1^{F77A/F77A}$ -Tiere. Die heterozygote Gruppe liegt mit ihren Mittelwerten meist zwischen den beiden übrigen Gruppen und weist im Vergleich zur Kontrollgruppe in einzelnen Messgrößen ebenfalls signifikante Abweichungen im Sinne eines vermehrten depressionsähnlichen Verhaltens auf. Die beschriebenen Unterschiede zwischen den Testgruppen liegen allerdings ausschließlich an den ersten beiden Messzeitpunkten vor, am letzten Testzeitpunkt im Alter von 16 Wochen sind keine Differenzen mehr feststellbar. Über die Gründe hierfür lässt sich lediglich spekulieren. Da der Forced-Swim-Test in der Regel ein- bis maximal dreimal innerhalb kurzer Zeitintervalle durchgeführt wird (Cryan und Mombereau, 2004; Petit-Demoulière et al., 2005), liegen kaum Erkenntnisse vor, wie die Tiere auf eine längere Adaptationszeit zwischen den Tests reagieren. Möglicherweise setzen bei dreimaliger Exposition und längeren Intervallen zwischen den Testungen bei den Versuchstieren Adaptations-, Habituations- und Lernprozesse ein (Parra et al., 1999), die folglich bei den unterschiedlichen getesteten Genotypen zu gleichartigen Verhaltensänderungen führen können. Da Parra und Coautoren ab einer Intervalllänge >18 d keine Adaptationseffekte berichten und die Intervallzeit in dieser Arbeit 28 Tage beträgt, könnten alternative Mechanismen für diesen Befund verantwortlich sein.

Signifikant längere Rearings der homozygoten Knockin-Tiere am letzten Messpunkt könnten einen angsthähnlichen Effekt des $STAT1$ -Tetramerisierungsdefizits im Offenfeldtest andeuten, der grundsätzlich durch anxiogenes, aktiveres Verhalten den Forced-Swim-Test beeinflussen könnte. Allerdings liegen entsprechende Tendenz ausschließlich innerhalb eines Parameters vor und scheinen demzufolge keinen konfundierenden Einfluss auszuüben.

Ein alternativer Erklärungsansatz für das Verhalten im FST ist möglicherweise der Einfluss einer durch die Mutation veränderten Neurogenese oder Neuroplastizität, auf den in einem späteren Abschnitt genauer eingegangen wird. Erstaunlicherweise steigern die Tiere der homozygoten $STAT1^{F77A/F77A}$ -Gruppe ihre Aktivität am dritten Testzeitpunkt wieder. Eventuell liegt hier auch ein Kreuzungspunkt zwischen einem früh auftretenden depressiven und einem später folgenden antidepressiven Phänotypen der transgenen

Tiere vor. Diese Problematik ließe sich ausschließlich durch eine Langzeitbeobachtung klären.

Durch die Konzeption des FST ergeben sich aus den Verhaltensunterschieden der eingesetzten Knockin-Mauslinie Differenzen in der physiologischen Reaktion auf akuten Stress. Da akuter Stress ein wichtiger empirischer und experimenteller Risikofaktor für die Entwicklung einer Depressivität ist, spricht vieles für eine wichtige Beteiligung der STAT1-vermittelten Genexpression in der stressinduzierten Körperreaktion bzw. der Pathogenese der Zytokin-induzierten Depression. Diese Ergebnisse der STAT1-Variante sind allerdings mitunter schwierig in die bestehenden Publikationen einzuordnen. Bei einer selektiven Unterbrechung des Interferon- γ -Signalweges konnten bislang keine eindeutigen experimentellen Verhaltensänderungen im FST veröffentlicht werden. Sowohl die Arbeitsgruppen um Litteljohn und Saito berichten von keinen Genotyp-bedingten Einflüssen auf die erhobenen Parameter (Litteljohn et al., 2010; Saito et al., 2010). Einzig O'Connor et al. schildern eine Einflussnahme des Interferon- γ -Signalweges auf das depressionsähnliche Verhalten. Nach einer Immunstimulation mit Bacillus Calmette-Guerin (BCG) zeigen Kontrolltiere ca. eine Woche später eine gesteigerte Immobilität im FST. Dieser depressive Effekt kann bei Versuchsmäusen ohne Interferon- γ -Rezeptor (IFN- γ -R-KO) weitgehend verhindert werden. Der Vergleich der unstimulierten, NaCl-behandelten behandelten Kontrollgruppe versus der gleichartig behandelten IFN- γ -R-KO-Gruppe erbrachte jedoch weiterhin keine statistisch signifikanten Unterschiede (O'Connor et al., 2009a).

Die Applikation von Interferon- γ zur Untersuchung der pharmakologischen Aktivität dieses Zytokins erzielte ebenfalls keine signifikanten Effekte auf das experimentelle Verhalten im FST (Makino et al., 1998). Diese Resultate konnten von Kwant und Sakic mittels eines Interferon- γ -exprimierenden Adenovirus bestätigt werden. Allerdings konnten sie im ebenfalls depressionsassoziierten Zuckerlösungstest einen anhedonischen Effekt beobachteten (Kwant und Sakic, 2004).

Experimente zu Evaluierung der pharmakologischen Aktivität auf IFN- α -regulierten Zielgenen durch die externe Applikation von Interferon- α bei Nagern hatten bislang sowohl depressive als auch antidepressive Effekte im FST zur Folge (Makino et al., 1998; Makino et al., 2000; Fahey et al., 2007; Orsal et al., 2008; Wang et al., 2009). Das gänzliche Ausbleiben von statistisch sichtbaren Effekten durch die Manipulation wurde gleichfalls in einigen Arbeiten berichtet (de la Garza et al., 2005; Loftis et al., 2006). So

bewirkt auch die chronische Überstimulation des ZNS mit Interferon- α keine messbaren Verhaltensänderungen (Zhang et al., 2010). Einzig die Studie von Wang und Kollegen (Wang et al., 2009) berichtete über Ergebnisse, die mit den hier erzielten Resultaten für den Interferon- γ -Weg vergleichbar sind. Die Autoren beschrieben einen Rückgang der Immobilität im FST nach Interferon- α -Gabe und diskutieren als Ursache hierfür einen in der anfänglichen Therapiephase auftretenden neuropsychiatrischen Konfusionseffekt.

Der Forced-Swim-Test wird häufig aufgrund seines akuten und unphysiologischen Stressors kritisiert, der nach Kritikermeinung eher eine Angstreaktion auf Stress als ein spezifisches depressionsähnliches Verhalten hervorruft (Gardier und Bourin, 2001). Daneben gilt die Anschlagzeit eines Pharmakons im Gegensatz zum Menschen als zu kurz, sodass die pathophysiologische antidepressive Ähnlichkeit des Tiermodells kritisiert wird. Aufgrund dieser Schwachstellen gilt der FST meist nicht als potentes Tiermodell der Depression. Allerdings stellt er heute immer noch den am häufigsten verwendeten Test zur Überprüfung von antidepressiven oder depressiven Effekten eines Medikaments oder des Genotyps einer Mauslinie dar. Letztere Anwendung des FST wird teilweise ebenfalls kritisch beurteilt, da nach mancher Autorenmeinung eine Validierung der Basisaktivität von Kontrolltieren notwendig sei, um Auswirkungen verlässlich detektieren zu können (Gardier und Bourin, 2001). Aufgrund unterschiedlicher Endophänotypen der tierischen Depression und des inkonstanten Wirkungsnachweises von Interferonen im FST (Kwant und Sakic, 2004; Loftis et al., 2010) ist es grundsätzlich möglich, dass dieser Verhaltenstest nicht das optimale Modell für die Detektion von depressionsähnlichen Effekten im Interferon-Kontext darstellt. Demzufolge sollten künftig weitere Untersuchungen mit anderen Depressionsmodellen erfolgen.

Da die Daten des Baseline-Tests nicht in einem durchgängigen Testablauf, sondern an unterschiedlichen Zeitpunkten in fünf einzelnen Kohorten erhoben wurden, könnte diese Art der Datengewinnung Auswirkungen auf die Gesamtergebnisse haben. Ein konfundierender Einfluss der unterschiedlichen Messzeitpunkte durch die Kohorten-getrennte Testung sowie die abweichenden Versuchsarenen lässt sich in der Auswertung nicht nachweisen. Die nicht näher aufgeführte statistische Analyse ergab somit keine eindeutige Beeinflussung der Messergebnisse durch diese potentiellen Störvariablen. Möglicherweise könnte die nach Kohorten getrennte Testdurchführung sogar mögliche Messunsicherheiten eines Beobachtungszeitpunkts durch die Erfassung von fünf verschiedenen Mittelwerten in streng standardisierten Umgebungen und Abläufen ausgleichen.

Generell sind unterschiedliche experimentelle Tests erforderlich, um depressionsassoziierte Verhaltensunterschiede bei Knockout- oder transgenen Mausmodellen zu erforschen (Cryan und Mombereau, 2004). Dies liegt an der Problematik, dass beispielsweise verminderte lokomotorische Aktivität oder gestörtes Lernverhalten Auswirkungen auf depressionsassoziiertes Testverhalten besitzt. Eine Maus, die sich vergleichsweise weniger bewegt, wird auch eine größere Immobilität im FST zeigen und damit als depressiver eingeschätzt werden (Loftis et al., 2010). Aus diesem Grund wurden die transgenen STAT1^{F77A}-Versuchsmäuse in einer Batterie von unterschiedlichen Verhaltensmodellen getestet. Die Resultate zeigten in Analogie zu den Prätest-Erwartungen die größte Trennschärfe zwischen den Gruppen im depressionsprüfenden Forced-Swim-Test. Die vorrangig kontrollierenden Verhaltensversuche des Rotarod- und Offenfeldtests erbrachten keine Auffälligkeiten zwischen den Mauslinien, sodass sich hieraus keine Erklärung oder Beeinflussung des depressiven Phänotyps der STAT1^{F77A}-Mauslinie begründet.

Mögliche Erklärungsansätze für den depressiven Phänotyp der experimentell untersuchten STAT1^{F77A}-Mauslinie sollten die Frage einschließen, welche zellulären Mechanismen für diese Resultate verantwortlich sind. Die STAT1^{F77A}-Mauslinie besitzt als spezifische Eigenschaft eine defiziente Interferon- γ -Antwort als Folge einer dysfunktionalen aminoterminal-aminoterminalen Interaktion im STAT1-Homodimer, wie der isolierte Befund einer verminderten Expression des *mig*-Gens nahe legt. Dabei ist die Interaktionsfläche mit dem kritischen Phenylalanin in Position 77 nicht nur für kooperative DNA-Bindung zwischen zwei benachbarten Monomeren unterschiedlicher Dimere zur Tetramerstabilisierung notwendig (siehe Abb. 10A), sondern könnte auch für den intermolekularen Konformationswechsel von einer DNA-gebundenen, parallelen Form zu einer antiparallelen, nicht-DNA-gebundenen Konformation benötigt werden. Ein solcher Konformationsshift zwischen zwei unterschiedlichen Dimerkonformationen wurde für das STAT1-Molekül beschrieben (Zhong et al., 2005; Mertens et al., 2006). Dabei ist die von Phenylalanin 77 eingeschlossene Oberflächenstruktur für die Ausbildung der anti-parallelen Dimerstruktur essentiell, wahrscheinlich weil durch aminoterminal-aminoterminalen Wechselwirkungen die beiden Monomere eines Dimers beim Konformationsshift strukturell zusammengehalten werden. Im Falle einer Mutation dieses kritischen Aminosäurerestes könnte sich deshalb nicht die anti-parallele Dimerkonformation ausbilden, die das Substrat für die inaktivierende Tc45-Phosphatase wäre. Gemäß dieser Vorstellung wäre die in Zellkulturexperimenten beobachtete Hyperphosphorylie-

rung und verlängerte Kernakkumulation der STAT1^{F77A}-Mutation problemlos für den inhibitierten Konformationswechsel erklärbar. Die F77A-Mutante wäre über funktionell unbeeinträchtigte Phosphotyrosin-SH2-Interaktionen gleichsam in der parallelen Dimerform arretiert, die den Zellkern nach stattgefundenem Importin-vermittelten Import nicht mehr verlassen kann.

Diese mechanistische Erklärung ließe sich überdies bruchlos mit den beobachteten Ergebnissen aus den Verhaltensexperimenten erklären und wäre geeignet, die antagonistischen Effekte von Typ-I- und Typ-II-Interferonen auf die Depressionsentstehung zu beschreiben. Denn nur Interferon-Typ-II-Antworten bedürfen ausschließlich des STAT1-Homodimers, während bei Stimulation mit Interferonen vom Typ I auch STAT1-STAT2-Heterodimere gebildet werden. Möglicherweise spielen Interaktionen zwischen den Aminotermini von STAT1-STAT2-Dimeren aber nicht die Rolle, die ihnen im Zyklus der STAT1-Deaktivierung zukommt. Sollte sich die supprimierte Genaktivierung in weiteren systematischen Untersuchungen als selektiv für den Interferon- γ -Weg herausstellen, ergäben sich die unterschiedlichen Effekte der Interferone als ein differentiellies Antwortmuster für Typ-I- und Typ-II-Interferone.

Nicht auszuschließen ist, dass auch in Abwesenheit einer Infektion konstante Basisspiegel an Interferonen im Organismus der transgenen Tiere vorliegen, die eine lokal niedrig-schwellige STAT1-Aktivierung hervorrufen. Die Aktivierung der STAT1-Signaltransduktionskaskade bewirkt anschließend die Zielgenaktivierung der Interferon-abhängigen Transkription. Eine im Rahmen der STAT1^{F77A}-Mutation differentielle basale Interferon-responsive Genexpression könnte die dokumentierten Resultate in den Verhaltenstests deshalb auslösen. Die Testergebnisse der verhaltensbiologischen Testung stehen im Einklang damit, nämlich ein profundes depressionsassoziiertes Verhalten der Mauslinie STAT1^{F77A}, und weisen dem STAT1-Aminoterminus eine Rolle bei der Protektion von depressiven Verhaltensmustern in der Antwort auf Interferon- γ zu.

Während für Interferon- α eine enge Assoziation zu depressiven Symptomen sowohl im Menschen als auch im Tierversuch beschrieben wurde (Makino et al., 1998; Loftis et al., 2004; Fahey et al., 2007), deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass Interferon- γ , anders als Interferon- α , kein depressionsauslösendes Zytokin ist, sondern im Gegenteil als ein anti-depressiogenes Molekül aufgefasst werden kann. Das STAT1-Tetramerisierungsdefizit löst nach den Ergebnissen dieser Studie einen depressiven Phänotyp im Forced-Swim-Test aus. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Erkenntnis,

dass die Interferone vom Typ I und II nicht generell in der Lage sind, Sickness-Behavior im Tiermodell auszulösen. Die Applikation von Interferon- γ ruft in Tierversuchen ebenfalls kein depressionsähnliches Verhalten hervor. Im Gegensatz hierzu ist Interferon- α durchaus in der Lage, sowohl im experimentellen Modell die Depression zu simulieren (Makino et al., 1998; Fahey et al., 2007) als auch depressive Symptome als Medikamentennebenwirkung beim Menschen hervorzurufen (Schaefer et al., 2002; Loftis et al., 2004). Bereits diese Befunde deuten auf einen Antagonismus der beiden essentiell über STAT1 signalisierenden Zytokine IFN- α und - γ hin. Die Verhaltensanalyse der Interferon- γ -defizitären Mauslinie zeigte, wie beschrieben, einen depressionsassoziierten Phänotyp im Forced-Swim-Test und steht damit konträr zu den beobachteten Phänotypen nach einer Interferon- α -Applikation, die in einigen Arbeiten Hinweise auf eine depressiogene Wirkung des Zytokins nachweisen konnten.

Worin liegen mögliche Ursachen für den vermuteten Antagonismus von IFN- α und - γ hinsichtlich der Auslösung von Depressionen begründet? Diese Unterschiede ergeben sich wahrscheinlich aus den distinkten biologischen Funktionen dieser Interferone bei der Bekämpfung von Infektionserkrankungen. Das depressionsauslösende Interferon- α ist vorrangig an der Bekämpfung viraler Infektionen beteiligt. Eine erfolgreiche Elimination dieser häufig epidemisch auftretenden und mit großer Kontagiösität verlaufenden Infektionen könnte die Ansteckungsgefahr über die Auslösung depressiver Verhaltensmuster minimieren. Ein mit der Depression verbundener sozialer Rückzug könnte die Mitglieder der gleichen Sozialgruppe vor der Übertragung von hochkontagiösen Viren schützen. Solche Virusinfektionen verlaufen in der Regel floride und mit Einsetzen der STAT1-vermittelten antiviralen kommt es in den weitaus meisten Fällen wieder zu einer vollständigen Heilung. Eine Kopplung von antiviralen, über Interferon- α -regulierten Signalwegen, mit der Auslösung von depressivem Verhalten erscheint unter diesem Gesichtspunkt durchaus plausibel. Die soziale Isolation vermindert die Ansteckungsgefahr und ermöglicht eine optimale Auseinandersetzung des Organismus mit dem invadierenden Pathogen.

Im Gegensatz hierzu ist Interferon- γ maßgeblich für die Immunabwehr latent oder chronisch verlaufender bakterieller Infektionen verantwortlich, zu denen paradigmatisch Listeriose, Mykobakteriose oder Tuberkulose zählen. Eine Aktivierung von Interferon- γ bewirkt nach Infektion mit diesen zumeist niedrig virulenten, mäßig kontagiösen Infektionen eine Aufrechterhaltung lebenswichtiger Funktionen, wie Nahrungsbeschaffung,

Fluchtaktivität und sexueller Fortpflanzung. Speziell die Erhaltung der Reproduktionsfähigkeit eines chronisch erkrankten Individuums, unter Umständen verbunden mit einer Libidozunahme, könnte der Weitergabe des genetischen Materials dienen. Hier könnten die antidepressiven, STAT1-vermittelten Interferon- γ -Effekte durchaus von Vorteil sein, da sie einer Investition in Reproduktionsprogramme gleichkämen.

Diese Interpretation der biologischen Funktion von Interferon- γ erweitert das Konstrukt des Sickness-Behavior oder der Zytokin-induzierten Depression. Während die meisten Zytokine depressionsähnliche Verhaltensprogramme initiieren oder verstärken, trifft dies für Interferon- γ nach den eigenen Ergebnissen wohl nicht zu. Dieser Vorstellung gemäß fördert die Aktivierung der Interferon- γ -abhängigen Genexpression neben den bekannten immunologischen Effekten eine Aufrechterhaltung der physischen und mentalen Integrität auch unter den Bedingungen einer systemischen, intrazellulär stattfindenden Infektion. Die postulierte Funktion von Interferon- γ im Sickness-Behavior sowie der Zytokin-induzierten Depression zeigt erstmalig eine antagonistische Aktivität eines Zytokins gegenüber Typ-I-Interferonen in diesem Syndrom und widerspricht in diesem Zusammenhang einer einheitlichen Wirkung proinflammatorischer Mediatoren auf das Zentralnervensystem.

Aus Ergebnissen der Arbeitsgruppe Vinkemeier ist bekannt, dass Tiere mit einer defizitären Interferon- γ Signaltransduktion erhöhte Spiegel des Zytokins aufweisen. Ähnliche Veränderungen publizierte die Gruppe von Varinou bei STAT1^{S727A}-Tieren, die einen posttranslationalen Phosphorylierungsdefekt zeigen (Varinou et al., 2003).

Diese Veränderung in der Balance des Zytokinhaushalts könnten die detektierten antidepressiven Effekte erklären. Für Interferon- γ sind sowohl konstitutiv aktives unphosphoryliertes STAT1 als auch STAT-unabhängige Signalwege beschrieben, deren Expressionsprodukte wie IRF-1, IRF-7, ISGF-15 und LMP-2 eng mit Auslösung von depressiven Verhaltensmustern verknüpft sind (Chatterjee-Kishore et al., 2000; Yang und Stark, 2008).

Herabgesetzte Spiegel der Neurotransmitter Serotonin, Dopamin und Noradrenalin sind bei depressiven Patienten ein bekannter Befund (Maes und Meltzer, 1995; Schatzberg und Schildkraut, 1995) und Angriffsziel der gegenwärtigen medikamentösen antidepressiven Therapie. Für Interferon- γ ist zwar einerseits eine Aktivierung des Serotonin depletierenden Enzyms IDO bekannt, allerdings wird auch durch Expressierung der NO-Synthase die Stickstoffmonoxid-Produktion in zentralnervösen Synapsen gesteigert.

Hierdurch kommt es einerseits zu einer Blockierung der IDO und einer Erhöhung des in geringen Dosen antidepressiv wirksamen Stickmonoxid (NO) (Dhir et al. 2011). Insofern wäre ein STAT1-vermittelter antidepressiver Effekt von Interferon- γ erklärbar.

Potentielle systemische Mechanismen der Vermittlung der oben beschriebenen Effekte könnten der Kortisonregelkreis sowie das Neurotransmittersystem sein. Chronischer Stress scheint bei Interferon- γ -Defizienz komplexe Effekte auf den Kortisol-Haushalt auszuüben, die zum Teil widersprüchlich und insgesamt aber wenig verstanden sind (Holsboer et al., 1988; Litteljohn et al., 2010). Die Arbeitsgruppe um Litteljohn berichtete von verminderter Kortikosteroid-Freisetzung bei stress-exponierten Interferon- γ -defizienten Mäusen, während Holsboer und Mitarbeiter eine Kortisol-stimulierende Wirkung von humanem Interferon- γ bei männlichen Versuchspersonen beschrieben. Abweichungen der physiologischen Parameter im Bereich der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPA-Achse) können erwiesenermaßen ursächlich für die Entstehung einer Depression sein (Lopez et al., 1998). Außerdem ist in einigen verhaltensexperimentellen Tierversuchen die Beteiligung des Glukokortikoidsystems an depressiogenen Verhaltensweisen gezeigt worden (Cryan und Mombereau, 2004). Da ein globales Interferon- γ -Defizit in den STAT1^{F77A}-Mäusen sehr wahrscheinlich ist, könnten unter Umständen veränderte Freisetzungsraten von Nebennierenrindenhormonen bei den transgenen Tieren die beobachteten Verhaltensauffälligkeiten modulieren.

Ein depressionsassoziiierter Phänotyp in Knockout- oder transgenen Mauslinien ist bislang nur in wenigen Studien beschrieben. Die selektive Deletion des Interleukin-2-Rezeptors führt nach Wu et al. zu einer depressionsassoziierten Verhaltensänderung im Sinne einer gesteigerten Immobilität im FST. Die Autoren erklären diesen Effekt durch ein verändertes Gedächtnislernen sowie Veränderungen in der Neurogenese in depressionsrelevanten Strukturen durch den artifiziellen Verlust der Zytokinfunktionen (Wu et al., 2010). Da auch in den STAT1^{F77A}-Mäusen die zytokinvermittelte Beeinflussung der Neurogeneseaktivität verändert sein könnte, ergibt sich hierdurch ein weiterer Erklärungsansatz für die gemessenen Verhaltensabweichungen. Im Gehirn erwachsener Tiere findet der Neurogeneseprozess vorrangig in depressionsrelevanten ZNS-Regionen, wie Hippocampus, Kortex und Hirnstamm, statt, wo sich außerdem die größte Anzahl an Zytokinrezeptoren befindet. Bei der Entwicklung von neuronalen Strukturen üben Zytokine grundsätzlich pleiotrope Wirkungen aus. Diese hängen von der Art des Zytokins,

seiner Konzentration und dem anatomischen Ort seiner Freisetzung ab und beeinflussen die Apoptose von neuronalen Zellen, die synaptische glutamaterge Aktivität, die Induktion von oxidativem Stress sowie weitere Effektoren (Buntinx et al., 2004; Miller et al., 2009). Zytokine können auch trophische Unterstützung für bestimmte Neuronen und stimulierende Impulse auf die Neuroplastizität ausüben, die als Voraussetzung für eine regelhafte Entwicklung von kognitiven Funktionen angesehen werden (Hayley et al., 2005; Miller et al., 2009). Auch für Interferon- γ gelten diese modulierenden Effekte auf die neuronale Gewebsarchitektur. Zum einen ist eine Aktivierung der Mikroglia mit reaktiver Gliosis, Hypomyelinisierung und dopaminergen Neuronenverlust bekannt (Corbin et al., 1996; Mount et al., 2007). Auf der anderen Seite übt dieses Zytokin auch eine protektive Funktion durch die Stimulation von Mikrogliazellen aus und fördert die Neurogenese (Butovsky et al., 2006; Baron et al., 2008; Whitney et al., 2009). Aufbauend auf diesen Erkenntnissen ist es denkbar, dass eine supprimierte Interferon- γ -abhängige Genexpression zu einer reduzierten neurogenetischen Stimulation in den STAT1^{F77A}-Tiere führt. Da bei Depressionserkrankten eine Verminderung an synaptischen Verknüpfungen und ein zerebraler Zellverlust beschrieben ist (Hayley et al., 2005; Campbell und MacQueen, 2006), liegt der Gedanke nahe, dass eine Depletion der IFN- γ -Antwort zum depressionsassoziierten Phänotyp der STAT1^{F77A}-Mauslinie beiträgt bzw. eine Dysbalance in den IFN- α - und IFN- γ -vermittelten Effekten auf die Neurogenese besteht. Kürzlich wurde außerdem ein differentieller Effekt der beiden Zytokine auf die zerebrale Aktivierung der induzierbaren NOS sowie der Hämoxxygenase-1 (HO-1) (Lu et al., 2013). Interferon- γ ist zusätzlich in der Lage einen inhibierenden Effekt auf das proinflammatorische und depressiogene Zytokin TNF- α in stimulierten Neuronen auszuüben.

Interessanterweise tritt nach Baron und Kollegen ein Effekt von Interferon- γ auf die Neurogenese in Versuchsmäusen erst nach 3 Monaten auf (Baron et al., 2008). Da die Angleichung des Verhaltens im FST nach diesem Lebenszeitpunkt erfolgt, ist ein Einfluss der Neurogenese auch auf die Veränderung des depressionsassoziierten Verhaltens der STAT1^{F77A}-Mauslinie vorstellbar. Ob tatsächlich die STAT1-Variante zu einer gestörten zerebralen Neurogenese führt und welche biochemischen Mechanismen dieses bedingen, könnte durch neurohistologische Untersuchungen beantwortet werden.

Bei der Spermatogenese im Drosophila-Hoden konnte eine Beteiligung des JAK-STAT-Signalweges bei der Regeneration und asymmetrische Zellteilung von Stammzellen

beobachtet werden (Tulina und Matunis, 2001; Kiger et al., 2001; Castelli-Gair Hombria et al., 2002). Bei Suppression des JAK/STAT-Signalweges kommt es zu einer unzureichenden Regeneration des gonadalen Stammzellpools und zu einer einseitigen Ausdifferenzierung adulter Zellen. Da dieser Pool erschöpflich ist, tritt nach einer gewissen Lebenszeit ein Verlust der differenzierten Zellen ein (Kiger et al., 2001; Tulina und Matunis, 2001). In der Übertragung dieses Prozesses auf die Stammzellen innerhalb des zentralen Nervensystems könnte in vergleichbarer Weise nach einem bestimmten Zeitintervall ein neuronaler Zellverlust eintreten. Doch ist eine STAT1-vermittelte Differenzierung auf Stammzellniveau bislang bei Mäusen oder Menschen nicht beschrieben worden.

Als weiteren Erklärungsansatz für das depressionsassoziierte Verhalten der STAT1^{F77A}-Mauslinie können von Interferon unabhängige Effekte auf das Zentralnervensystem nicht ausgeschlossen werden. Erste verhaltensrelevante Hinweise für eine Exekution von biologischen Interferon-Funktionen ohne Beteiligung des STAT1-Signalweges fanden Wang und Kollegen. Sie berichten, dass die pathophysiologischen Effekte einer neurogenen Überexpression von Interferon- α bei Einkreuzen von STAT1-Knockout-Mäusen aggraviert sind (Wang et al., 2002). Diese und andere Autoren erklären das unerwartete Resultat mit der Aktivität von Interferon- α -stimulierten Signalwegen, die ihre Effekte nicht via STAT1 vermitteln (Ramana et al., 2002; Qing und Stark, 2004; Yang und Stark, 2008).

Aus diesen Publikationen ist bekannt, dass im Falle einer Blockade der STAT1-abhängigen Genaktivierung molekularbiologische Mechanismen in Kraft treten, die hauptsächlich durch STAT3 transduziert werden. Im Gegenteil zu den antiproliferativen Effekten von STAT1 ist STAT3 in proliferativen Prozessen beteiligt. Ferner werden beide STAT-Transkriptionsfaktoren von grundlegend unterschiedlichen Zytokinen (IFN versus IL-6) aktiviert, sodass der Ersatz der Transkriptionsaktivität von STAT1 durch STAT3 zu Verhaltensänderung des betroffenen Organismus führen könnte. Interleukin-6, das essentielle Zytokin des STAT3-Weges, ist sowohl beim Menschen als auch im Tierversuch eng mit der Ausbildung einer depressiven Erkrankung verknüpft. Erhöhte Interleukin-6 Spiegel als Inflammationsmarker sind bei depressionserkrankten Patienten einer der häufigsten und stabilsten Befunde (Maes et al., 1993a, Maes et al., 1993b; Levine et al., 1999). Sowohl die Stimulation von Versuchstieren mit Interleukin-6 wie auch die Untersuchung von IL-6-Knockout-Tieren zeigte Verhaltensänderungen, die den Rückschluss auf eine relevante Beteiligung dieses Zytokins in der Pathogenese der

Depression zulassen (Heyser et al., 1997; Sakic et al., 2001; Chourbaji et al., 2006). Eine verstärkte Aktivität von Interleukin-6 und der STAT3-vermittelten Effekte im Organismus der STAT1^{F77A}-Mauslinie wären folglich ebenfalls in der Lage, das aufgedeckte depressive Verhalten zu verursachen.

Die deskriptive Analyse des Überlebens eines LPS-induzierten septischen Schocks von STAT1^{F77A/F77A}-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Kontrolltieren zeigte in dieser Studie einen klaren Überlebensvorteil der transgen veränderten Versuchstiere (vgl. Abb. 35). Die höhere Überlebensrate nach intraperitonealer LPS-Injektion lässt sich weder aus Altersunterschieden der Versuchstiere noch aus der eingesetzten Dosis pro Körpergewicht erklären, da sich beide Parameter nicht signifikant unterscheiden. Eine verminderte Aktivierung der Interferon- γ -abhängigen Genexpression in der F77A-Variante übt also potentiell einen protektiven Einfluss auf die Überlebensrate der Versuchsmäuse aus. Dieses Resultat gleicht Publikationen, die ebenfalls über eine schützende Wirkung einer Unterbrechung des Interferon- γ -regulierten STAT1-Weges berichteten (Car et al., 1994; Varinou et al., 2003; Kamezaki et al., 2004; van Schaik und Abbas, 2007).

Pathophysiologisch begründet sich möglicherweise die höhere Überlebensrate der STAT1^{F77A/F77A}-Linie in einer supprimierten Genexpression durch den Interferon- γ -Signalweg. Bei Wildtyp-Tieren kommt es durch die LPS-Exposition zu einem vasodilatativen Schock mit Kreislaufversagen, während in den STAT1^{F77A/F77A}-Tieren die inhibierte IFN- γ -abhängige Genexpression hier protektiv wirken könnte. Einen besonderen Stellenwert nimmt in diesem Zusammenhang die verminderte Aktivierung des für die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase kodierenden Gens ein, gleiches wurde für die ebenfalls transkriptionell suppressierte Punktmutante STAT1^{S727A} bereits gezeigt (Varinou et al., 2003).

Zur genaueren Charakterisierung der Bedeutung von STAT1 innerhalb des Ablaufs einer Entzündungsreaktion wurde das Verhalten der transgenen STAT1^{F77A}-Mauslinie im Vergleich zu Wildtypkontrollen über einen zehntägigen Zeitraum für jeweils 15-Minuten im Offenfeldtest erfasst. Die intraperitoneale LPS-Injektion ist ein häufig angewandtes Verfahren, um im Versuchstier einen anhand von Offenfeldparametern vergleichsweise leicht zu messenden und standardisierten Krankheitszustand zu induzieren. Die tägliche Verhaltens Erfassung im Offenfeldtest sollte darüber hinaus ein Bild der Krankheits- und Erholungsphase abgeben und dementsprechend sowohl Komponenten des Sickness-Behavior als auch der Zytokin-induzierten Depression abbilden.

Die beobachtete deutliche Reduktion des Körpergewichts (s. Abb. 36) nach der Injektion ist im Rahmen des Sickness-Behavior zu werten und betraf in unseren Experimenten alle drei getesteten Genotypen; sie ist in Übereinstimmung mit einschlägigen Literaturangaben zu den systemischen Effekten von LPS (Qin et al., 2007; O'Connor et al., 2009b; Fu et al., 2010).

Bereits beim Ausgangsgewicht der eingeschlossenen Versuchstiere liegen signifikante Unterschiede vor, sodass eine gewichtsadaptierte Infektionsdosis gewählt wurde. Trotz dieser Maßnahme kommt es im Versuchsverlauf über die zehntägige Testdauer in der messwiederholten Analyse zu signifikant differierenden Körpergewichtsverlusten der drei getesteten Genotypen (vgl. Abb. 36). Da dieser Effekt für die Kombination der Faktoren Behandlung und Genotyp vorliegt, könnte neben der erwarteten Körpergewichtsreduktion durch LPS in der untersuchten Mauslinie von einem Einfluss der herabgesetzten STAT1-abhängigen Aktivierung Interferon-responsiver Zielgene auf die Gewichtsentwicklung ausgegangen werden. Die Resultate des Einzelpunktvergleichs unterstützen diese These jedoch nicht, sodass kein klarer Effekt der herabgesetzten STAT1-Aktivität auf das Körpergewicht vorliegt. Eine Auswirkung der Gewichtsunterschieden auf die Parameter des Offenfeldtests lässt sich im Übrigen nicht nachweisen.

Der statistische Vergleich der Messparameter im Offenfeldtest zeigte bei einigen Variablen signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen; stark ausgeprägte Verhaltensdifferenzen über mehrere zusammenhängende Messgrößen ließen sich jedoch nicht nachweisen. Die Entwicklung der zurückgelegten Distanzen über die gesamte Testdauer wird statistisch signifikant durch den Genotyp beeinflusst. Zusätzlich sind marginal signifikant längere zurückgelegte Strecken der STAT1^{WT/WT}-Gruppe 48 h nach der Injektion (Tag 3) im Vergleich zu den LPS-behandelten transgenen Gruppen nachzuweisen (s. Abb. 37). Neben diesen Differenzen liegt ebenso ein höheres Aktivitätsniveau der STAT1^{F77A/F77A}-Versuchsmäuse ab 96 h nach Injektion (Tag 5) durch signifikant längeres vertikales Aufrichtverhalten vor (vgl. Abb. 41). Ferner lassen sich zusätzlich Trends in den Mittelwerten weiterer Messgrößen beschreiben. An den ersten beiden Testtagen nach der Behandlung (Tag 2 und 3) zeigen die gemessenen Aktivitätsparameter der Kontrolltiere stets höhere Werte als die beiden transgenen Gruppen. Diese Resultate können durch einen zeitlich zuvor durchgeführten Versuch bestätigt werden, welcher aufgrund einer geringen Fallzahl, bedingt durch eine hohe Sterblichkeitsrate, nicht weiter beschrieben wurde. Auch hier zeigen die getesteten 6-7 Monate alten, STAT1^{F77A/F77A}-Versuchsmäuse durch eine Infektion mit 300 µg LPS pro Versuchs-

maus 24 und 48 h nach Infektion eine stärkere Beeinträchtigung der Aktivität und somit eine profundere Ausbildung des Sickness-Behavior.

Durch die relativ hoch gewählte Testdosis (5 mg/kg Körpergewicht) ist ein Literaturvergleich mit ähnlich durchgeführten LPS-Versuchen schwierig, da diese meist niedrigere Endotoxindosen verwendeten. Deshalb sind auch die Zeitspannen bis zum Auftreten von Sickness-Behavior und Zytokin-induzierter Depression nicht unmittelbar mit den Literaturangaben vergleichbar (Dantzer et al., 2008; O'Connor et al., 2009a; O'Connor et al., 2009b). Auch in diesen Publikationen bedingt die Auseinandersetzung mit Endotoxin konstant einen Rückgang der Aktivitätsmarker im Offenfeld sowie simultan einen deutlichen Gewichtsverlust.

Nach der Prätest-Erwartung sollte bei den homozygoten STAT1^{F77A/F77A}-Mäusen durch die eingeschränkte Immunaktivierung ein vermindertes Ansprechen auf die LPS-Stimulation und entsprechend eine reduzierte Ausbildung des Sickness-Behavior zu beobachten sein. Nichtsdestotrotz zeigen die transgenen STAT1^{F77A}-Tiere in der initialen Testphase (Tag 2 bis 4) eine geringfügig stärkere Aktivitätseinschränkung durch die LPS-Applikation. Diese Differenz wird in der reduzierten zurückgelegten Strecke am Testtag 3 statistisch marginal signifikant. Einen Erklärungsansatz für dieses Ergebnis liefert die integrative Betrachtung des Baseline-Tests mit der Verhaltensanalyse unter Infektionsbedingungen. Eine fehlende Ausbildung des antidepressiven Effekts einer Interferon- γ -abhängigen Genexpression könnte zu dem leicht verstärkten Sickness-Behavior unter immunstimulierten Bedingungen führen. Darüberhinaus ist für eine Blockade der induzierbaren Stickstoffsynthese eine verminderte Ausbildung eines Sickness Behaviors durch die Reduktion der aktiven Spiegel der depressiogenen Botenstoffe Kortisol und TNF- α bekannt (Connor et al., 2003; Ribeiro et al., 2013).

Ab Tag 5 der Testabfolge des Expositionstests (96 h nach der LPS-Injektion) liegen nach der statistischen Analyse durch eine verlängerte Gesamtdauer der Rearings in der STAT1^{F77A/F77A}-Gruppe Hinweise für ein höheres Aktivitätsniveau der homozygoten transgenen Tiere im Vergleich zur Referenzgruppe der Wildtyp-Tiere vor. Eine verlängerte Gesamtdauer des Aufrichtverhaltens spricht für ein wiedererlangtes Explorationsverhalten und gegen einen Interessensverlust der Versuchstiere an der Erkundung des Testgeländes.

Insgesamt ergeben sich hieraus in der Auswertung Anzeichen für eine schnellere Erholung der STAT1^{F77A7/F77A}-exprimierenden Versuchsmäuse in diesem fortgeschrittenen

Zeitraum des Testablaufs. Diese Deutung gleicht den Ergebnissen der Gruppe um O'Connor, die nach der immunstimulierenden Applikation von Interferon- γ -Knockout-Mäusen mit Bacillus Calmette-Guérin (BCG) eine Reduktion des depressionsähnlichen Verhaltens im FST berichten. Die Genexpression des Enzyms IDO bewirkt nach einer Immunstimulation das verzögert auftretende depressionsähnliche Verhalten von Versuchsmäusen (Frenois et al., 2007; Moreau et al., 2008; O'Connor et al., 2009a). Da Lipopolysaccharid als ein potenter Induktor der IDO-induzierenden Zytokine Interferon- γ und TNF- α gilt (O'Connor et al., 2009a), wären bei einem Defekt in den STAT1-transkribierten Zielgenen ähnliche Verhaltenskonsequenzen zu erwarten.

Für einen erkrankten Organismus scheint die Ausbildung von Sickness-Behavior sinnvoll zu sein, da das Individuum von der Änderung zahlreicher Körperfunktionen mit einer erhöhten Überlebenswahrscheinlichkeit profitiert. Die tetramerisierungsdefizite Mauslinie STAT1^{F77A} spricht durch die supprimierte IFN- γ -vermittelte Genexpression als Folge der aminoterminalen Punktmutante nach dem Überlebenstest weniger vulnerabel auf die Immunstimulation an, zeigt allerdings gleichzeitig bei einer subletalen Dosis LPS verstärktes Sickness-Behavior. Die hier dokumentierten Resultate des Expositionsversuchs mit Endotoxin bestätigen die zahlreichen Publikationen, die von einer wertvollen Adaptation im Krankheitsfall im Kontext des Sickness-Behavior berichten (Aubert, 1999; Dantzer, 2001; Dantzer et al., 2008).

Zusammengefasst präsentieren die STAT1^{F77A}-Mäuse in den durchgeführten Experimenten einen konsistenten Phänotyp, der depressionsähnliche Verhaltensänderungen im unstimulierten Immunzustand, einen Überlebensvorteil in der gramnegativen Sepsis und ein ausgeprägtes Sickness-Behavior nach LPS-Exposition mit einem schnellen Erholungspotential kombiniert.

Bei der kritischen Betrachtung der Testergebnisse fällt in einigen Teilbereichen ein großes Streuungsmaß in Form beträchtlicher Standardabweichungen auf. Größere Schwankungen in den Mittelwerten liegen speziell im Rotarod-Test sowie im Offenfeldtest mit und ohne Immunstimulation vor. Die Detektion statistisch signifikanter Effekte in den entsprechenden Tests wird durch diese Problematik sicherlich erschwert. Eine Vergrößerung der eingesetzten Probandenanzahl hätte möglicherweise weitere Unterschiede zwischen den Genotypen aufdecken können. Die relativ geringe Fallzahl in den jeweiligen Gruppen ermöglicht nach der Analyse dennoch eine zufriedenstellende statistische Teststärke und aussagekräftige Resultate in den meisten der verwendeten Testreihen.

Die Gruppenstärke in den durchgeführten Verhaltensexperimenten wurde unter Abwägung tierschutzrechtlicher, logistischer und statistischer Argumente ausgewählt. Ein weiterer Grund für die detektierten Streumaße kann eine fehlende Habituation der Testtiere vor der Verhaltensfassung sein. Häufig können durch eine Gewöhnung der Mäuse an die experimentelle Testsituation beständigere Verhaltensergebnisse generiert werden. Auf eine solche Prozedur wurde jedoch bewusst verzichtet, um die Reaktion der Versuchstiere auf die initiale Testexposition in die Verhaltensanalyse integrieren zu können.

Ein Auswahlverfahren von Versuchsmäusen, das nicht uneingeschränkt Tiere aus heterozygoten Zuchtpaaren in die Experimente einschließt (Crawley und Paylor, 1997), wirkt sich möglicherweise negativ auf die Homogenität der Gesamtpopulation aus. Zusätzlich sind in zwei Tests (SIT, LPS-Expositionstest) extern erworbene Tiere als Kontrollen genutzt worden. Neben dem zusätzlichen Stressor des Transports und der primär unbekannten Haltungsumgebung unterlagen diese Tiere eventuell Aufzuchtbedingungen, die sich von denen der übrigen, im BMFZ geborenen, Testmäuse unterschieden. Zur Stärkung der Testgruppenhomogenität wurden einige Tiere aus der Datenanalyse und der statistischen Auswertung ausgeschlossen.

Die Generierung von transgenen Mausmodellen liefert der Forschung die Möglichkeit einzelne biologische Komponenten selektiv zu verändern und ihre Bedeutung im organismischen Kontext zu überprüfen. Hierbei ist kritisch anzumerken, dass die Mutation im Organismus bereits pränatal besteht und somit die gesamte Entwicklung des Tieres beeinflussen kann. Mögliche Einflussnahmen der genetischen Aberration auf nicht getestete Komponenten lassen sich experimentell kaum adäquat kontrollieren (Picciotto und Wickman, 1998). Des Weiteren ist es theoretisch möglich, dass ein genetisch modifiziertes Protein andersgeartete Wirkungen in unterschiedlichen Organsystemen besitzt. Eine solche Einflussnahme der Veränderungen ist stets in Betracht zu ziehen und kann die Interpretation der Ergebnisse verkomplizieren (Urani et al., 2007).

Die angewendete Methode der automatisierten Verhaltensfassung mittels digitaler Analyse unter Einsatz eines Software-Programms hat sich in der Verhaltensforschung als eine einfach zu handhabende und effiziente Methode zur Gewinnung valider Testergebnisse herausgestellt (Sams-Dodd, 1995; Schwarz et al., 2002; Kurtuncu et al., 2005). Die benutzte Filter-Kontrast-Methode zeigt sich jedoch teilweise als störanfällig. Dies trifft besonders für Mäuse mit hellerer Fellfarbe zu, die aber in dieser Studie nicht ver-

wendet wurden. Bei einigen Datenerhebungen ergab sich die Problematik, dass eine unsaubere Detektion in den Offenfeldecken zu hohe Werte des Distanz- und Aktivitätsniveaus der Testtiere ermittelte. Dieser Fehler musste durch eine Reanalyse der Videos korrigiert werden. Die Auswertung der Verhaltensdaten zeigte jedoch keine Unterschiede zwischen den reanalysierten und den Originaldaten, sodass keine Auswirkungen der Reanalysen auf den gesamten Datensatz nachzuweisen sind. Allein die gute Korrelation der Resultate des Baseline- und des kontrollbehandelten Expositionstests weist eine hohe Reliabilität und Validität der erhobenen Verhaltensdaten zwischen den verschiedenen Zeitpunkten, Kohorten und Analyseverfahren nach.

Zur genauen Phänotypisierung der transgenen Mäuse und zum Ausschluss konfundierender Faktoren sollten weitere Verhaltenstests künftig die STAT1^{F77A}-Mauslinie spezieller charakterisieren. Beispielsweise konnte der Elevated-Plus-Maze-Test seine Bedeutung bereits bei Interferon- γ -defizienten Versuchsmäusen nachweisen und spielt als angstassoziiertes Test eine wichtige Rolle in der Verhaltensforschung. Für einen präziseren Literaturvergleich wäre die Verhaltenstestung der STAT1^{F77A}-Linie in diesem Modell wünschenswert. Wie bereits Wu und Kollegen (Wu et al., 2010) andeuteten, sind Gedächtnis-kontrollierende Tests nützlich für den Ausschluss von konfundierenden Einflüssen auf das depressionsähnliche Verhalten, sodass auch diese experimentellen Verhaltensversuche konfundierende Einflüsse ausschließen könnten. Bekanntermaßen erhöht ein fortgeschrittenes Lebensalter die Anfälligkeit von Mäusen für Immunstimulanzen (Lacosta et al., 1999; Godbout et al., 2008). Insofern könnte der Einsatz von älteren Mäusen in einer Infektionssimulation potentielle Unterschiede zwischen den Genotypen deutlicher hervortreten lassen. Eine Wiederholung des Expositionstests mit geänderter Altersstruktur möglichst unter Einschluss von STAT1-Knockout-Tieren mit gleichem genetischen Hintergrund wäre deshalb wünschenswert.

Zukünftige Studien sind dringend notwendig, um die Ergebnisse der vorliegenden Experimente genauer einordnen zu können. Hierzu gehört vorrangig eine präzise Beschreibung der physiologischen Veränderungen durch die STAT1^{F77A}-Mutation unter Einschluss umfangreicher immunologischer Testungen. Beispielsweise sollten depressionsassoziierte Inflammationsmarker, wie TNF- α , Interleukin-1 und -6, die Neurotransmitterkonzentrationen von Serotonin, Dopamin und Noradrenalin, die Blutspiegel der IDO und ihrer Reaktionsprodukte sowie die Komponenten der HPA-Achse quantitativ bestimmt werden. Dies gilt sowohl für den unstimulierten als auch den stimulierten Zustand des STAT1-Signalweges. Eine erneute Untersuchung des depressionsassoziierten

ten Phänotyps der STAT1^{F77A/F77A}-Tiere in weiteren experimentellen Verhaltenstests ist zusätzlich wünschenswert, um die Resultate des Forced-Swim-Tests zu bestätigen. Hierbei sind vor allem chronisch einwirkende Stressoren von Bedeutung, da deren Mechanismen vermutlich eine Depression ätiologisch besser modellieren als der Forced-Swim-Test. Daneben verspricht eine neurohistologische Auswertung relevanter Hirnareale weitere Einsichten in die zerebralen Auswirkungen der aminoterminalen STAT1-Mutation.

Diese zusätzlichen Kenntnisse über die physiologischen Auswirkungen eines STAT1-Tetramerisierungsdefektes werden sicherlich dazu beitragen, die Bedeutung der Interferon-Antwort bis auf transkriptioneller Ebene besser und umfassender verstehen zu können. Unabdingbar ist also zunächst eine eingehende Charakterisierung der transkriptionellen Eigenschaften des mutierten Transkriptionsfaktors in verschiedenen Zellen und Organsystemen unter einer Vielzahl von experimentellen Bedingungen. Dabei steht die Rolle der kooperativen DNA-Bindung von STAT1 bei der Bekämpfung verschiedener Pathogene durch geeignete *In-vivo*- und *In-vitro*-Versuche im Vordergrund. Damit im Zusammenhang steht die weiterführende Frage, ob ein an die Zielstruktur von F77 angreifendes, STAT1-spezifisches Medikament über die Suppression transkriptioneller Aktivität die ansonsten bei Sepsis sehr hohe Letalität vermindern könnte. Auch wenn diese Vision mit den Ergebnissen dieser Studie durchaus vereinbar ist, so wäre dann besonderes auf eine pharmakologisch induzierte Depression als eine mögliche und klinisch bedeutsame Nebenwirkung zu achten.

5. Zusammenfassung

Zytokine spielen in der Pathogenese der humanen Depression eine zentrale Rolle; dafür sprechen die Beobachtung depressiver Reaktionen als klinische Nebenwirkung im Zusammenhang mit einer Interferon- α -Therapie und die erhöhten Serumspiegel einiger inflammatorischer Zytokine bei Depressionserkrankten. In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung der kooperativen DNA-Bindung des Transkriptionsfaktor STAT1 (Signaltransduktor und Aktivator der Transkription 1) für die Entstehung einer Depression untersucht. Der Austausch eines kritischen Aminosäurerestes in der aminoterminalen Proteindomäne (F77A) bewirkt über eine Inhibition der Tetramerbildung und eine reduzierte Tyrosin-Dephosphorylierung von STAT1 eine Suppression der transkriptionellen Aktivierung von Interferon- γ -responsiven Zielgenen, wie dem *miG1*-Gen. In Verhaltensexperimenten unter Verwendung eines Knockin-Mausmodells zeigten homozygote transgene STAT1^{F77A/F77A}-Mäuse einen depressionsassoziierten Phänotyp im Forced-Swim-Test ohne besondere Auffälligkeiten in lokomotions- und angstprüfenden Testreihen. Der STAT1^{F77A/F77A}-Genotyp besitzt einen protektiven Effekt auf das Überleben nach intraperitonealer Lipopolysaccharid-(LPS)-Injektion der transgenen Mäuse und bewirkte eine verstärkte Beeinträchtigung des Krankheitsverhaltens in einem frühen Stadium mit verkürzter Rekonvaleszenzphase. Zusammenfassend bewirkt die fehlende kooperative DNA-Bindung von STAT1 einen depressionsassoziierten Phänotyp mit gleichzeitigem Überlebensvorteil nach isolierter LPS-Gabe. Diese unerwarteten Resultate sprechen dafür, dass Interferon- γ , im strikten Gegensatz zu Typ-I-Interferonen, antidepressogene Effekte ausübt und dass diese über STAT1 vermittelt werden.

6. Summary

Cytokines play a key role in the pathogenesis of major depressive disorder, as has been shown by the induction of depressive symptoms in interferon- α -treated patients as well as elevated serum levels of pro-inflammatory cytokines in depressed patients. In this thesis, the behavioural effects of a point mutation in the transcription factor STAT1 were investigated (signal transducer and activator of transcription 1), which resulted in a defect in cooperative DNA-binding. A substitution of a critical amino acid residue in the aminoterminal domain of STAT1 (F77A) resulted in impaired tetramer formation and defective tyrosine dephosphorylation, leading to decreased transcriptional activation of interferon- γ -responsive target genes such as *mig1*. In behavioural experiments using a knockin-mouse model, homozygous mice carrying the F77A missense mutation showed a depressive-like behaviour in the forced swim test without any apparent changes in locomotion and anxiety associated tests. The transgenic STAT1^{F77A/F77A} mice showed an elevated survival rate upon intraperitoneal injection of lipopolysaccharide (LPS) and experienced impaired sickness behaviour in an early stage as compared to wild-type mice with faster recovery. Overall, the loss of cooperative DNA binding of STAT1 was associated with a depression-like behaviour and an elevated survival rate following exposure to LPS. These unexpected results suggest that in stark contrast to type I interferons, interferon- γ initiates antidepressive effects, which are mediated by the transcription factor STAT1.

7. Literaturverzeichnis

Amodio, P., De Toni, E.N., Cavalletto, L., Mapelli, D., Bernardinello, E., Del Piccolo, F., Bergamelli, C., Costanzo, R., Bergamaschi, F., Poma, S.Z., Chemello, L., Gatta, A., Perini, G. (2005) Mood, cognition and EEG changes during interferon (α IFN) treatment for chronic hepatitis C. *J Affect Disord.* 84(1), 93–98.

Angelucci, F., Brene, S., Mathe, A.A. (2005) BDNF in schizophrenia, depression and corresponding animal models. *Mol Psychiatry.* 10(4), 345–352.

Anisman, H., Poulter, M.O., Gandhi, R., Merali, Z., Hayley, S. (2007) Interferon-alpha effects are exaggerated when administered on a psychosocial stressor backdrop: cytokine, corticosterone and brain monoamine variations. *J Neuroimmunol.* 186(1-2), 45–53.

Anisman, H., Merali, Z., Hayley, S. (2008) Neurotransmitter, peptide and cytokine processes in relation to depressive disorder: comorbidity between depression and neurodegenerative disorders. *Prog Neurobiol.* 85(1), 1–74.

Arai, I., Tsuyuki, Y., Shiimoto, H., Satoh, M., Otomo, S. (2000) Decreased body temperature dependent appearance of behavioral despair in the forced swimming test in mice. *Pharmacol Res.* 42(2), 171–6.

Archer, J. (1973) Tests for emotionality in rats and mice: a review. *Anim Behav.* 21(2), 205–235.

Aubert, A. (1999) Sickness and behaviour in animals: a motivational perspective. *Neurosci Biobehav Rev.* 23(7), 1029–36.

Asnis, G.M., De La Garza, R. (2006) Interferon-induced depression in chronic hepatitis C: a review of its prevalence, risk factors, biology, and treatment approaches. *J Clin Gastroenterol.* 40(4), 322–335.

Babcock, T.A., Carlin, J.M. (2000) Transcriptional activation of indoleamine dioxygenase by interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha in interferon-treated epithelial cells. *Cytokine.* 12(6), 588–594.

Bächli, H., Steiner, M., Habersetter, U., Wotjak, C. (2008) Increased water temperature renders single-housed C57BL/6J mice susceptible to antidepressant treatment in the forced swim test. *Behav Brain Res.* 187(1), 67–71.

Bai, F., Li, X., Clay, M., Lindstrom, T., Skolnick, P. (2001) Intra- and interstrain differences in models of “behavioral despair”. *Pharmacol Biochem Behav.* 70(2-3), 187–192.

Baron, R., Nemirovsky, A., Harpaz, I., Cohen, H., Owens, T., Monsonego, A. (2008) IFN-gamma enhances neurogenesis in wild-type mice and in a mouse model of Alzheimer's disease. *The FASEB Journal.* 22(8), 2843–2852.

Basso, A.M., Bratcher, N.A., Harris, R.R., Jarvis, M.F., Decker, M.W., Rueter, L.E. (2009) Behavioral profile of P2X7 receptor knockout mice in animal models of depression and anxiety: relevance for neuropsychiatric disorders. *Behav Brain Res.* 198(1), 83–90.

- Bauhofer, A., Schwarting, R.K., Köster, M., Schmitt, A., Lorenz, W., Pawlak, C.R. (2004) Sickness behavior of rats with abdominal sepsis can be improved by antibiotic and G-CSF prophylaxis in clinic modeling randomized trials. *Inflamm Res.* 53(12), 697-705.
- Bauhofer, A., Ho, Y.-J., Schmitt, A., Köster, M., Schwarting, R.K.W., Pawlak, C.R. (2009) Individual behavioral differences in recovery from abdominal sepsis in rats. *Inflamm Res.* 58(5), 248-56.
- Benton, T., Lynch, K., Dubé, B., Gettes, D., Tustin, N., Lai, J., Metzger, D., Blume, J., Douglas, S., Evans, D. (2010) Selective serotonin reuptake inhibitor suppression of HIV infectivity and replication. *Psychosom Med.* 72(9), 925-32.
- Beutler, B., Rietschel, E.T. (2003) Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat Rev Immunol.* 3(2), 169–76.
- Blizard, D.A., Takahashi, A., Galsworthy, M.J., Martin, B., Koide, T. (2007) Test standardization in behavioural neuroscience: a response to Stanford. *J Psychopharmacol.* 21(2), 136-9.
- Blume, J., Douglas, S.D., Evans, D.L. (2011) Immune suppression and immune activation in depression. *Brain Behav Immun.* 25(2), 221-229.
- Bolivar, V.J., Caldarone, B.J., Reilly, A.A., Flaherty, L. (2000) Habituation of activity in an open field: a survey of inbred strains and F1 hybrids. *Behav Genet.* 30(4), 285–93.
- Bonaccorso, S., Marino, V., Biondi, M., Grimaldi, F., Ippoliti, F., Maes, M. (2002) Depression induced by treatment with interferon-alpha in patients affected by hepatitis C virus. *J Affect Disord.* 72(3), 237–241.
- Borsini, F., Meli, A. (1988) Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? *Psychopharmacology (Berl).* 94(2), 147–160.
- Brydon, L., Harrison, N.A., Walker, C., Steptoe, A., Critchley, H.D. (2008) Peripheral inflammation is associated with altered substantia nigra activity and psychomotor slowing in humans. *Biol Psychiatry.* 63(11), 1022–1029.
- Bucks, R.S., Gidron, Y., Harris, P., Teeling, J., Wesnes, K.A., Perry, V.H. (2008) Selective effects of upper respiratory tract infection on cognition, mood and emotion processing: a prospective study. *Brain Behav Immun.* 22(3), 399–407.
- Buntinx, M., Moreels, M., Vandenabeele, I., Lambrichts, I., Raus, J., Steels, P., Stinissen, P., Ameloot, M. (2004) Cytokine-induced cell death in human oligodendroglial cell lines: I. Synergistic effects of IFN-gamma and TNF-alpha on apoptosis. *J Neurosci Res.* 76(6), 834–845.
- Butovsky, O., Ziv, Y., Schwartz, A., Landa, G., Talpalar, A.E., Pluchino, S., Martino, G., Schwartz, M. (2006) Microglia activated by IL-4 or IFN-gamma differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells. *Mol Cell Neurosci.* 31(1), 149–160.
- Campbell, S., MacQueen, G. (2006) An update on regional brain volume differences associated with

mood disorders. *Curr Opin Psychiatry*. 19(1), 25–33.

Capuron, L., Ravaud, A., Gualde, N., Bosmans, E., Dantzer, R., Maes, M., Neveu, P.J. (2001) Association between immune activation and early depressive symptoms in cancer patients treated with interleukin-2-based therapy. *Psychoneuroendocrinology*. 26(8), 797–808.

Capuron, L., Gumnick, J.F., Musselman, D.L., Lawson, D.H., Reemsnyder, A., Nemeroff, C.B., Miller, A.H. (2002a) Neurobehavioral effects of interferon- α in cancer patients: phenomenology and paroxetine responsiveness of symptom dimensions. *Neuropsychopharmacology*. 26(5), 643–652.

Capuron, L., Ravaud, A., Neveu, P.J., Miller, A.H., Maes, M., Dantzer, R. (2002b) Association between decreased serum tryptophan concentrations and depressive symptoms in cancer patients undergoing cytokine therapy. *Mol Psychiatry*. 7(5), 468–473.

Capuron, L., Raison, C.L., Musselman, D.L., Lawson, D.H., Nemeroff, C.B., Miller, A.H. (2003a) Association of exaggerated HPA axis response to the initial injection of interferon- α with development of depression during interferon- α therapy. *Am J Psychiatr*. 160(7), 1342–1345.

Capuron, L., Neutrauer, G., Musselman, D.L., Lawson, D.H., Nemeroff, C.B., Fuchs, D., Miller, A.H. (2003b) Interferon- α -induced changes in tryptophan metabolism. Relationship to depression and paroxetine treatment. *Biol Psychiatry*. 54(9), 906–914.

Capuron, L., Fornwalt, F.B., Knight, B.T., Harvey, P.D., Ninan, P.T., Miller, A.H. (2009) Does cytokine-induced depression differ from idiopathic major depression in medically healthy individuals? *J Affect Disord*. 119(1–3), 181–185.

Car, B.D., Eng, V.M., Schnyder, B., Ozmen, L., Huang, S., Gallay, P., Heumann, D., Aguet, M., Ryffel, B. (1994) Interferon gamma receptor deficient mice are resistant to endotoxic shock. *J Exp Med*. 179(5), 1437–44.

Carola, V., D'Olimpio, F., Brunamonti, E., Mangia, F., Renzi, P. (2002) Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. *Behav Brain Res*. 134(1–2), 49–57.

Castelli-Gair Hombría, J., Brown, S. (2002) The Fertile Field of *Drosophila* JAK/STAT Signalling. *Curr Biol*. 12(16), 569–575.

Caston, J., Jones, N., Stelz, T. (1995) Role of preoperative and postoperative sensorimotor training on restoration of the equilibrium behavior in adult mice following cerebellectomy. *Neurobiol Learn Mem*. 64(3), 195–202.

Chatterjee-Kishore, M., Wright, K.L., Ting, J.P., Stark, G.R. (2000) How Stat1 mediates constitutive gene expression: a complex of unphosphorylated Stat1 and IRF1 supports transcription of the LMP2 gene. *EMBO J*. Aug 1;19(15), 4111–22.

- Chapgier, A., Wynn, R.F., Jouanguy, E., Filipe-Santos, O., Zhang, S., Feinberg, J., Hawkins, K., Casanova, J.L., Arkwright, P.D. (2006) Human complete Stat-1 deficiency is associated with defective type I and II IFN responses in vitro but immunity to some low virulence viruses in vivo. *J Immunol.* 176(8), 5078-5083.
- Chourbaji, S., Urani, A., Inta, I., Sanchis-Segura, C., Brandwein, C., Zink, M., Schwaninger, M., Gass, P. (2006) IL-6 knockout mice exhibit resistance to stress-induced development of depression-like behaviors. *Neurobiol Dis.* 23(3), 587–594.
- Clement, Y., Calatayud, F., Belzung, C. (2002) Genetic basis of anxiety-like behaviour: a critical review. *Brain Res Bull.* 57(1), 57–71.
- Connor, T.J., O'Sullivan, J., Nolan, Y., Kelly, J.P. (2003) Inhibition of constitutive nitric oxide production increases the severity of lipopolysaccharide-induced sickness behaviour: a role for TNF-alpha. *Neuroimmunomodulation.* 10(6), 367-78.
- Corbin, J.G., Kelly, D., Rath, E.M., Baerwald, K.D., Suzuki, K., Popko, B. (1996) Targeted CNS expression of interferon-gamma in transgenic mice leads to hypomyelination, reactive gliosis, and abnormal cerebellar development. *Mol Cell Neurosci.* 7(5), 354-70.
- Crawley, J.N., Paylor, R. (1997) A proposed test battery and constellations of the specific behavioral paradigms to investigate the behavioral phenotypes of transgenic and knockout mice. *Horm Behav.* 31(3), 197–211.
- Cryan, J.F., Markou, A., Lucki, I. (2002) Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends Pharmacol Sci.* 23(5), 238-245.
- Cryan, J.F., Mombereau, C. (2004) In search of a depressed mouse: utility of models for studying depression-related behavior in genetically modified mice. *Mol Psychiatr.* 9(4), 1050–1062.
- Dalla, C., Pitychoutis, P., Kokras, N., Papadopoulou-Daifoti, Z. (2010) Sex Differences in Animal Models of Depression and Antidepressant Response. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 106(3), 226-33.
- Dantzer, R. (2001) Cytokine-induced sickness behavior: mechanisms and implications. *Ann NY Acad Sci.* 933, 222–234.
- Dantzer, R., O'Connor, J.C., Freund, G.G., Johnson, R.W., Kelley, K.W. (2008) From inflammation to sickness and depression: When the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci.* 9(1), 46–56.
- Darnell, J.E., Kerr, I.M., Stark, G.R. (1994) Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science.* 264(5164), 1415-1421.
- Darnell, J.E. (1997) STATs and gene regulation. *Science.* 277(5332), 1630-1635.
- David, D.J., Nic Dhonnchadha, B.A., Jolliet, P., Hascoet, M., Bourin, M. (2001) Are there gender differences in the temperature profile of mice after acute antidepressant administration, exposure to two animal models of depression? *Behav Brain Res.* 119(2), 203-211.

- Decker, T., Kovarik, P., Meinke, A. (1997) GAS elements: a few nucleotides with a major impact on cytokine-induced gene expression. *J Interferon Cytokine Res.* 17(3), 121-134.
- De La Garza, R., Asnis, G.M., Pedrosa, E., Stearns, C., Migdal, A.L., Reinus, J.F., Paladugu, R., Vemulapalli, S. (2005) Recombinant human interferon-alpha does not alter reward behavior, or neuroimmune and neuroendocrine activation in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 29(5), 781-792.
- DellaGioia, N., Hannestad, J. (2010) A critical review of human endotoxin administration as an experimental paradigm of depression. *Neurosci Biobehav. Rev.* 34(1), 130-143.
- Detke, M.J., Rickels, M., Lucki, I. (1995) Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology (Berl).* 121(1), 66-72.
- Detke, M.J., Lucki, I. (1996) Detection of serotonergic and noradrenergic antidepressants in the rat forced swimming test: the effects of water depth. *Behav Brain Res.* 73(1-2), 43-46.
- Detke, M.J., Johnson, J., Lucki, I. (1997) Acute and chronic antidepressant drug treatment in the rat forced swimming test model of depression. *Exp Clin Psychopharmacol.* 5(2), 107-112.
- Dixon, L.K., Defries, J.C. (1968) Development of open field in mice: effects of age, experience. *Dev Psychobiol.* 1(2), 100-107.
- Dhir, A., Kulkarni, S.K. (2011) Nitric oxide and major depression. *Nitric Oxide.* 30, 24(3), 125-31.
- Dowlati, Y., Herrmann, N., Swardfager, W., Liu, H., Sham, L., Reim, E.K., Lanctot, K.L. (2010) A meta-analysis of cytokines in major depression. *Biol Psychiatry.* 67(5), 446-457.
- Dunn, A. J., Swiergiel, A. H., de Beaurepaire, R. (2005) Cytokines as mediators of depression: what can we learn from animal studies? *Neurosci Biobehav Rev.* 29(4.5), 891-909.
- Dupuis, S., Jouanguy, E., Al-Hajjar, S., Fieschi, C., Al-Mohsen, I.Z., Al-Jumaah, S., Yang, K., Chapgier, A., Eidenschenk, C., Eid, P., Al Ghonaium, A., Tufenkeji, H., Frayha, H., Al-Gazlan, S., Al-Rayes, H., Schreiber, R.D., Gresser, I., Casanova, J.L. (2003) Impaired response to interferon-alpha/beta and lethal viral disease in human STAT1 deficiency. *Nat Genet.* 33(3), 388-391.
- Durbin, J.E., Hackenmiller, R., Simon, M.C., Levy, D.E. (1996) Targeted disruption of the mouse Stat1 gene results in compromised innate immunity to viral disease. *Cell.* 84(3), 443-450.
- Evans, D.L., Charney, D.S., Lewis, L., Golden, R.N., Gorman, J.M., Krishnan, K.R., Nemeroff, C.B., Bremner, J.D., Carney, R.M., Coyne, J.C., Delong, M.R., Frasur-Smith, N., Glassman, A.H., Gold, P.W., Grant, I., Gwyther, L., Ironson, G., Johnson, R.L., Kanner, A.M., Katon, W.J., Kaufmann, P.G., Keefe, F.J., Ketter, T., Laughren, T.P., Leserman, J., Lyketsos, C.G., McDonald, W.M., McEwen, B.S., Miller, A.H., Musselman, D., O'Connor, C., Petitto, J.M., Pollock, B.G., Robinson, R.G., Roose, S.P., Rowland, J., Sheline, Y., Sheps, D.S., Simon, G., Spiegel, D., Stunkard, A., Sunderland, T., Tibbits Jr., P., Valvo, W.J. (2005). Mood disorders in the medically ill: scientific review and recommendations. *Biol Psychiatry.* 58(3), 175-189.

- Fahey, B., Hickey, B., Kelleher, D., O'Dwyer, A.M., O'Mara, S.M. (2007) The widely-used anti-viral drug interferon- α induces depressive- and anxiogenic-like effects in healthy rats. *Behav Brain Res.* 182(1), 80– 87.
- File, S.E., Hyde, J.R. (1978) Can social interaction be used to measure anxiety? *Br J Pharmacol.* 62(1), 19-24.
- File, S.E., Seth, P. (2003) A review of 25 years of the social interaction test. *Eur J Pharmacol.* 463(1-3), 35–53.
- Fishkin, R.J., Winslow, J.T. (1997) Endotoxin-induced reduction of social investigation by mice: interaction with amphetamine and anti-inflammatory drugs. *Psychopharmacology (Berl).* 132(4), 335-41.
- Foley, F.W., Traugott, U., LaRocca, N.G., Smith, C.R., Perlman, K.R., Caruso, L.S., Scheinberg, L.C. (1992) A prospective study of depression and immune dysregulation in multiple sclerosis. *Arch Neurol.* 49(3), 238–244.
- Fonseca, N., Sell, A., Carlini, E. (1976) Differential behavioral responses of male and female adult rats treated with five psychotropic drugs in the neonatal stage. *Psychopharmacology (Berl).* 46(3), 263-268.
- Frenois, F., Moreau, M., O'Connor, J., Lawson, M., Micon, C., Lestage, J., Kelley, K.W., Dantzer, R., Castanon, N. (2007) Lipopolysaccharide induces delayed FosB/DeltaFosB immunostaining within the mouse extended amygdala, hippocampus and hypothalamus, that parallel the expression of depressive-like behavior. *Psychoneuroendocrinology.* 32(5), 516–531.
- Fu, X., Zunich, S.M., O'Connor, J.C., Kavelaars, A., Dantzer, R., Kelley, K.W. (2010) Central administration of lipopolysaccharide induces depressive-like behavior in vivo and activates brain indoleamine 2,3 dioxygenase in murine organotypic hippocampal slice cultures. *J Neuroinflammation.* 2, 7, 43.
- Galef, B., Buckley, L. (1996) Use of foraging trails by Norway rats. *Anim Behav.* 51, 765-71.
- Gardier, A.M., Bourin, M. (2001) Appropriate use of knockout mice as models of depression or models of testing the efficacy of antidepressants. *Psychopharmacology (Berl).* 153(3), 393–394.
- Geerse, G.-J., Van Gurp, L., Wiegant, V., Stam, R. (2006) Individual reactivity to the open-field predicts the expression of cardiovascular and behavioural sensitisation to novel stress. *Behav Brain Res.* 175(1), 9-17.
- Gershenfeld, H.K., Paul, S.M. (1997) Mapping quantitative trait loci for fear-like behaviors in mice. *Genomics.* 15, 46(1), 1-8.
- Geyer, M.A., Markou, A. (2002) The role of preclinical models in the development of psychotropic drugs. In: Davis KL, Charney D, Coyle JT, Nemeroff C, editors. *Neuropsychopharmacology: the fifth generation of progress.* NY: Lippincott Williams Wilkins. 445–55.

- Gildengers, A.G., Whyte, E.M., Drayer, R.A., Soreca, I., Fagiolini, A., Kilbourne, A.M., Houck, P.R., Reynolds, C.F., Frank, E., Kupfer, D.J., Mulsant, B.H. (2008) Medical burden in late-life bipolar and major depressive disorders. *Am J Geriatr Psychiatry*. 16 (3), 194–200.
- Gingrich, J.A., Hen, R. (2000) The broken mouse: the role of development, plasticity and environment in the interpretation of phenotypic changes in knockout mice. *Curr Opin Neurobiol*. 10(1), 146-152.
- Godbout, J.P., Moreau, M., Lestage, J., Chen, J., Sparkman, N.L., O' Connor, J., Castanon, N., Kelley, K.W., Dantzer, R., Johnson, R.W. (2008) Aging exacerbates depressive-like behavior in mice in response to activation of the peripheral innate immune system. *Neuropsychopharmacology*. 33(10), 2341-51.
- Gohier, B., Goeb, J.L., Rannou-Dubas, K., Fouchard, I., Cales, P., Garre, J.B. (2003) Hepatitis C, alpha interferon, anxiety and depression disorders: a prospective study of 71 patients. *World J Biol Psychiatry*. 4(3), 115–118.
- Gould, T.D., Dao, D.T., Kovacsics, C.E. (2007) The open field test. in: Gould, T.D. (ed) *Mood and anxiety related phenotypes in mice*. *Neuromethods* 42. Humana press. Springer Science +Business Media.
- Greenlund, A.C., Morales, M.O., Viviano, B.L., Yan, H., Krolewski, J., Schreiber, R.D. (1995) Stat recruitment by tyrosine-phosphorylated cytokine receptors: an ordered reversible affinity-driven process. *Immunity*. 2(6), 677-687.
- Hall, C. S. (1934) Emotional behavior in the rat: Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *J Comp Psychology*. 18, 385-403.
- Hao, K., Cheng Li, Ch., Rosenow, C., Wong, W.H. (2004) Estimation of genotype error rate using samples with pedigree information-an application on the GeneChip Mapping 10K array. *Genomics*. 84(4), 623–630.
- Hart, B.L. (1988) Biological basis of the behavior of sick animals. *Neurosci Biobehav Rev*. 12(2), 123–137.
- Hascoet, M., Bourin, M. (2009) The Forced Swimming Test in mice: A suitable model to study antidepressants. in: Gould, T.D. (ed.) *Mood and Anxiety related Phenotypes in Mice*, *Neuromethods* 42, Humana Press, Springer Science+Business Media.
- Hashioka, S., Klegeris, A., Monji, A., Kato, T., Sawada, M., McGeer, P.L., Kanba, S. (2007) Antidepressants inhibit interferon- γ -induced microglial production of IL-6 and nitric oxide. *Exp Neurol*. 206(1), 33-42.
- Hasler, G., Drevets, W.C., Manji, H.K., Charney, D.S. (2004) Discovering endophenotypes for major depression. *Neuropsychopharmacology*. 29(10), 1765–1781.
- Haspel, R.L., Darnell, J.E. (1999) A nuclear protein tyrosine phosphatase is required for the inactivation of Stat1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96(18), 10188-10193.

- Hayley, S., Poulter, M.O., Merali, Z., Anisman, H. (2005) The pathogenesis of clinical depression: Stressor- and cytokine-induced alterations of neuroplasticity. *Neuroscience*, 135(3), 659-678.
- Heyser, C.J., Masliah, E., Samimi, A., Campbell, I.L., Gold, L.H. (1997) Progressive decline in avoidance learning paralleled by inflammatory neurodegeneration in transgenic mice expressing interleukin 6 in the brain. *Proc Natl Acad Sci*. 94(4), 1500-1505.
- Hiles, S.A., Baker, A.L., de Malmanche, T., Attia, J. (2012) Interleukin-6, C-reactive protein and interleukin-10 after antidepressant treatment in people with depression: a meta-analysis. *Psychol Med*. 2012 Feb 16, 1-12. [Epub ahead of print]
- Holmes, A. (2003) Mouse behavioral models of anxiety and depression. In: Crawley, J.N. (ed) *Mouse behavioral phenotyping*. Society for Neuroscience, Washington D.C., 43–47.
- Holsboer, F., Stalla, G.K., von Bardeleben, U., Hammann, K., Muller, H., Muller, O.A. (1988) Acute adrenocortical stimulation by recombinant gamma interferon in human controls. *Life Sci*. 42(1), 1–5.
- Horvath, C.M., Wen, Z., Darnell, J.E. (1995) A STAT protein domain that determines DNA sequence recognition suggests a novel DNA-binding domain. *Genes Dev*. 9(8), 984-994.
- Howren, M.B., Lamkin, D.M., Suls, J. (2009) Associations of depression with C-reactive protein, IL-1, and IL-6: a meta-analysis. *Psychosom Med*. 71(2), 171–186.
- Huffman, J.C., Smith, F.A., Quinn, D.K., Fricchione, G.L. (2006) Post-MI psychiatric syndromes: six unanswered questions. *Harv Rev Psychiatry*. 14(6), 305–318.
- Ihle, J.N. (2001) The Stat family in cytokine signaling. *Curr Opin Cell Biol*. 13(2), 211-217.
- John, S., Vinkemeier, U., Soldaini, E., Darnell, J.E., Leonard, W.J. (1999) The significance of tetramerization in promoter recruitment by Stat5. *Mol Cell Biol*. 19(3), 1910-1918.
- Irwin, M.R., Miller, A.H. (2007) Depressive disorders and immunity: 20 years of progress and discovery. *Brain Behav Immun*. 21(4), 374-83.
- Ivinskis, A. (1970) A study of validity of open-field measures. *Aust J Psychol*. 22, 175–183.
- Juengling, F.D., Ebert, D., Gut, O., Engelbrecht, M.A., Rasenack, J., Nitzsche, E.U., Bauer, J., Lieb, K. (2000) Prefrontal cortical hypometabolism during low-dose interferon alpha treatment. *Psychopharmacology (Berl)*. 152(4), 383–389.
- Kalueff, A.V., Tuohimaa, P. (2004) Experimental modeling of anxiety and depression. *Acta Neurobiol Exp. (Wars)*. 64(4), 439-48.
- Kamezaki, K., Shimoda, K., Numata, A., Matsuda, T., Nakayama, K. and Harada, M. (2004) The role of Tyk2, Stat1 and Stat4 in LPS-induced endotoxin signals. *Int Immunol*. 16(8), 1173-1179.
- Kask, A., Nguyen, H.P., Pabst, R., von Horsten, S. (2001) Factors influencing behavior of group-housed male rats in the social interaction test: focus on cohort removal. *Physiol Behav*. 74(3), 277–282.

- Katz, R.J., Roth, K.A., Carroll, B.J. (1981) Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression. *Neurosci Biobehav Rev.* 5(2), 247-51.
- Kendler, K.S., Thornton, L.M., Gardner, C.O. (2000) Stressful life events and previous episodes in the etiology of major depression in women: an evaluation of the 'kindling' hypothesis. *Am J Psychiatry.* 157(8), 1243–1251.
- Kessler, R.C., Berglund, P., Demler, O., Jin, R., Merikangas, K.R., Walters, E.E. (2005) Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch Gen Psychiatry.* 62(6), 593–602.
- Kiger, A., Jones, D.L., Schulz, C., Rogers, M.B., Fuller, M.T. (2001) Stem Cell Self-Renewal Specified by JAK-STAT Activation in Response to a Support Cell Cue. *Science.* 294(5551), 2542-5.
- Knol, M.J., Twisk, J.W., Beekman, A.T., Heine, R.J., Snoek, F.J., Pouwer, F. (2006) Depression as a risk factor for the onset of type 2 diabetes mellitus. A meta-analysis. *Diabetologia.* 49(5), 837–845.
- Konsman, J.P., Parnet, P., Dantzer, R. (2002) Cytokine-induced sickness behaviour: mechanisms and implications. *Trends Neurosci.* 25(3), 154–159.
- Koob, A.O., Cirillo, J., Babbs, C.F. (2006) A novel open field activity detector to determine spatial and temporal movement of laboratory animals after injury and disease. *J Neurosci Methods.* 157(2), 330-336.
- Krishnan, V., Nestler, E.J. (2008) The molecular neurobiology of depression. *Nature.* 455(7215), 894–902.
- Kulkarni, S.K., Dandiya, P.C. (1973) Effects of antidepressant agents on open field behaviour in rats. *Psychopharmacology (Berl).* 33(4), 333-338.
- Kurtuncu, M., Luka, L., Dimitrijevic, N., Zu., T, Manev, E. (2005) Reliability assessment of an automated forced swim test device using two mouse strains. *J Neurosci Methods.* 149(1), 26–30.
- Kustova, Y., Sei, Y., Morse III, H.C., Basile, A.S. (1998) The influence of a targeted deletion of the IFN- γ gene on emotional behaviors. *Brain Behav Immun.* 12(4), 308–324.
- Kwant, A., Sakic, B. (2004) Behavioral effects of infection with interferon-gamma adenovector. *Behav Brain Res.* 151(1-2), 73–82.
- Lacosta, S., Merali, Z., Anisman, H. (1999) Behavioral and neurochemical consequences of lipopolysaccharide in mice: anxiogenic-like effects. *Brain Res.* 818(2), 291–303.
- Lalonde, R., Bensoula, A.N., Filali, M. (1995) Rotarod sensorimotor learning in cerebellar mutant mice. *Neurosci Res.* 22(4), 423–426.
- Larson, S.J., Dunn, A.J. (2001) Behavioral effects of cytokines. *Brain Behav Immun.* 15(4), 371–387.
- Leonard, B.E. (2010) The concept of depression as a dysfunction of the immune system. *Curr Immunol*

Rev. 6(3), 205–212.

Lestage, J., Castanon, N. (2008) Inoculation of *Bacillus Calmette-Guerin* to mice induces an acute episode of sickness behavior followed by chronic depressive-like behavior. *Brain Behav Immun.* 22(7), 1087–1095.

Levine, J., Barak, Y., Chengappa, K.N., Rapoport, A., Rebey, M., Barak, V. (1999) Cerebrospinal cytokine levels in patients with acute depression. *Neuropsychobiology.* 40(4), 171–176.

Levy, D.E., Darnell, J.E. (2002) Stats: Transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3(9), 651–662.

Litteljohn, D., Mangano, E., Shukla, N., Hayley, S. (2009) Interferon- γ deficiency modifies the motor and co-morbid behavioral pathology and neurochemical changes provoked by the pesticide paraquat. *Neuroscience.* 164(4), 1894–1906.

Litteljohn, D., Cummings, A., Brennan, A., Gill, A., Chunduri, S., Anisman, H., Hayley, S. (2010) Interferon-gamma deficiency modifies the effects of a chronic stressor in mice: Implications for psychological pathology. *Brain Behav Immun.* 24(3), 462–73.

Liu, L., Okada, S., Kong, X.F., Kreins, A.Y., Cypowyj, S., Abhyankar, A., Toubiana, J., Itan, Y., Audry, M., Nitschke, P., Masson, C., Toth, B., Flatot, J., Migaud, M., Chrabieh, M., Kochetkov, T., Bolze, A., Borghesi, A., Toulon, A., Hiller, J., Eyerich, S., Eyerich, K., Gulácsy, V., Chernyshova, L., Chernyshov, V., Bondarenko, A., Grimaldo, R.M., Blancas-Galicia, L., Beas, I.M., Roesler, J., Magdorf, K., Engelhard, D., Thumerelle, C., Burgel, P.R., Hoernes, M., Drexel, B., Seger, R., Kusuma, T., Jansson, A.F., Sawalle-Belohradsky, J., Belohradsky, B., Jouanguy, E., Bustamante, J., Bué, M., Karin, N., Wildbaum, G., Bodemer, C., Lortholary, O., Fischer, A., Blanche, S., Al-Muhsen, S., Reichenbach, J., Kobayashi, M., Rosales, F.E., Lozano, C.T., Kilic, S.S., Oleastro, M., Etzioni, A., Traidl-Hoffmann, C., Renner, E.D., Abel, L., Picard, C., Maródi, L., Boisson-Dupuis, S., Puel, A., Casanova, J.L. (2011) Gain-of-function human STAT1 mutations impair IL-17 immunity and underlie chronic mucocutaneous candidiasis. *J Exp Med.* 208(8), 1635–1648.

Loftis, J.M., Hauser, P. (2004) The phenomenology and treatment of interferon-induced depression. *J Affect Disord.* 82(2), 175–190.

Loftis, J.M., Wall, J.M., Pagel, R.L., Hauser, P. (2006) Administration of pegylated interferon-alpha-2a or -2b does not induce sickness behavior in Lewis rats. *Psychoneuroendocrinology.* 31(10), 1289–1294.

Loftis, J.M., Huckans, M., Morasco, B. (2010) Neuroimmune mechanisms of cytokine-induced depression: Current theories and novel treatment strategies. *Neurobiol Dis.* 37(3), 519–533.

Lopez, J.F., Chalmers, D.T., Little, K.Y., Watson, S.J. (1998) Regulation of serotonin 1A, glucocorticoid, and mineralocorticoid receptor in rat and human hippocampus: implications for the neurobiology of depression. *Biol Psychiatry.* 43(8), 547–573.

- Lu, Y.C., Yeh, W.C., Ohashi, P.S. (2008) LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*. 42(2), 145-51.
- Lu, D.Y., Leung, Y.M., Su, K.P. (2013) Interferon- α induces nitric oxide synthase expression and haem oxygenase-1 down-regulation in microglia: implications of cellular mechanism of IFN- α -induced depression. *Int J Neuropsychopharmacol*. 16(2) 433-44.
- Lucki, I. (1997) The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. *Behav Pharmacol*. 8(6-7), 523-532.
- Maes, M. (1993a) A review on the acute phase response in major depression. *Rev Neurosci*. 4(4), 407-416.
- Maes, M., Scharpe, S., Meltzer, H.Y., Bosmans, E., Suy, E., Calabrese, J., Cosyns, P. (1993b) Relationships between interleukin-6 activity, acute phase proteins, and function of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in severe depression. *Psychiatr Res*. 49(1), 11-27.
- Maes, M., Meltzer, H.Y. (1995) The serotonin hypothesis of major depression. In: *Psychopharmacology: the third generation of progress* (Bloom, F.E. et al. (eds.)), New York: Raven Press. 993-944.
- Maes, M., Song, C., Lin, A., De Jongh, R., Van Gastel, A., Kenis, G., Bosmans, E., De Meester, I., Benoy, I., Neels, H., Demedts, P., Janca, A., Scharpé, S., Smith, R.S. (1998). The effects of psychological stress on humans: increased production of pro-inflammatory cytokines and a Th1-like response in stress-induced anxiety. *Cytokine*. 10, 313-318.
- Maes, M., Song, C., Lin, A.H., Bonaccorso, S., Kenis, G., De Jongh, R., Bosmans, E., Scharpe, S. (1999) Negative immunoregulatory effects of antidepressants: inhibition of interferon-gamma and stimulation of interleukin-10 secretion. *Neuropsychopharmacol*. 20(4), 370-379.
- Maes, M., Capuron, L., Ravaut, A., Gualde, N., Bosmans, E., Egyed, B., Dantzer, R., Neveu, P.J. (2001) Lowered serum dipeptidyl peptidase IV activity is associated with depressive symptoms and cytokine production in cancer patients receiving interleukin-2-based immunotherapy. *Neuropsychopharmacol*. 24(2), 130-140.
- Maes, M., Mihaylova, I., DeRuyter, M.D., Kubera, M., Bosmans, E. (2007) The immune effects of TRYCATs (tryptophan catabolites along the IDO pathway): relevance for depression—and other conditions characterized by tryptophan depletion induced by inflammation. *Neuro Endocrinol Lett*. 28(6), 826-831.
- Maes, M., Yirmiya, R., Noraberg, J., Brene, S., Hibbeln, J., Perini, G., Kubera, M., Bob, P., Lerer, B., Maj, M. (2009) The inflammatory & neurodegenerative (I&ND) hypothesis of depression: leads for future research and new drug developments in depression. *Metab Brain Dis*. 24(1), 27-53.
- Makino, M., Kitano, Y., Hirohashi, M., Takasuna, K. (1998) Enhancement of immobility in mouse forced swimming test by treatment with human interferon. *Eur J Pharmacol*. 356(1), 1-7.

- Makino, M., Kitano, Y., Komiyama, C., Hirohashi, M., Kohno, M., Moriyama, M., Takasuna, K. (2000) Human interferon-alpha induces immobility in the mouse forced swimming test: involvement of the opioid system. *Brain Res.* 852(2), 482–484.
- Matsuo, N., Takao, K., Nakanishi, K., Yamasaki, N., Tanda, K., Miyakawa, T. (2010) Behavioral profiles of three C57BL/6 substrains. *Front Behav Neurosci.* 14, 4: 29.
- McArthur, R., Borsini, F. (2006) Animal models of depression in drug discovery: a historical perspective. *Pharmacol Biochem Behav.* 84(3), 436–52.
- McIlwain, K.L., Merriweather, M.Y., Yuva-Paylor, L.A., Paylor, R. (2001) The use of behavioral test batteries: effects of training history. *Physiol Behav.* 73(5), 705–17.
- McKinney, W.T.J., Bunney, W.E.J. (1969) Animal model of depression. Review of evidence: implications for research. *Arch Gen Psychiatry.* 21(2), 240–248.
- Mendlewicz, J., Kriwin, P., Oswald, P., Souery, D., Alboni, S., Brunello, N. (2006) Shortened onset of action of antidepressants in major depression using acetylsalicylic acid augmentation: a pilot open-label study. *Int Clin Psychopharmacol.* 21(4), 227–231.
- Meraz, M.A., White, J.M., Sheehan, K.C., Bach, E.A., Rodig, S.J., Dighe, A.S., Kaplan, D.H., Riley, J.K., Greenlund, A.C., Campbell, D., Carver-Moore, K., DuBois, R.N., Clark, R., Aguet, M., Schreiber, R.D. (1996) Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. *Cell.* 84(3), 431–442.
- Mertens, C., Zhong, M., Krishnaraj, R., Zou, W., Chen, X., Darnell, J.E.Jr. (2006) Dephosphorylation of phosphotyrosine on STAT1 dimers requires extensive spatial reorientation of the monomers facilitated by the N-terminal domain. *Genes Dev.* 20, 3372–3381.
- Meyer, T., Gavenis, K., Vinkemeier, U. (2002a) Cell-type specific and tyrosine phosphorylation-independent nuclear presence of STAT1 and STAT3. *Exp Cell Res.* 272(1), 45–55.
- Meyer, T., Begitt, A., Lödige, I., van Rossum, M., Vinkemeier, U. (2002b) Constitutive and IFN-g-induced nuclear import of STAT1 proceed through independent pathways. *EMBO J.* 21(3), 344–354.
- Meyer, T., Marg, A., Lemke, P., Wiesner, B., Vinkemeier, U. (2003) DNA binding controls inactivation and nuclear accumulation of the transcription factor Stat1. *Genes Dev.* 17(16), 1992–2005.
- Meyer, T., Hendry, L., Begitt, A., John, S., Vinkemeier, U. (2004) A single residue modulates tyrosine dephosphorylation, oligomerization, and nuclear accumulation of Stat transcription factors. *J Biol Chem.* 279(18), 18998–19007.
- Meyer, T., Vinkemeier, U. (2007) STAT nuclear translocation: potential for pharmacological intervention. *Expert Opin Ther Targets.* 11, No. 10, 1355–1365.
- Miller, A.H., Maletic, V., Raison, C.L. (2009) Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. *Biol Psychiatry.* 65(9), 732–741.

- Miller, A.H. (2010) Depression and immunity: a role for T cells? *Brain Behav Immun.* 24(1), 1-8.
- Minasyan, A., Keisala, T., Zou, J., Zhang, Y., Toppila, E., Syväälä, H., Lou, Y.R., Kalueff, A.V., Pyykkö, I., Tuohimaa, P. (2009) Vestibular dysfunction in vitamin D receptor mutant mice. *Steroid Biochem Mol Biol.* 114(3-5), 161-6.
- Monteggia, L. M., Luikart, B., Barrot, M., Theobald, D., Malkovska, I., Nef, S., Parada, L.F., Nestler, E.J. (2007) Brain-derived neurotrophic factor conditional knockouts show gender differences in depression-related behaviors. *Biol Psychiatry.* 61(2), 187–197.
- Montgomery, K.C., Monkman, J.A. (1955) The relation between fear and exploratory behavior. *J Comp Physiol Psychol.* 48(2), 132–6.
- Moran, L.B., Duke, D.C., Graeber, M.B. (2007) The microglial gene regulatory network activated by interferon-gamma. *J Neuroimmunol.* 183(1-2), 1– 6.
- Moreau, M., André, C., O'Connor, J.C., Dumich, S.A., Woods, J.A., Kelley, K.W., Dantzer, R., Lestage, J., Castanon, N. (2008) Inoculation of *Bacillus Calmette-Guerin* to mice induces an acute episode of sickness behavior followed by chronic depressive-like behavior. *Brain Behav Immun.* 22(7), 1087-95.
- Mount, M.P., Lira, A., Grimes, D., Smith, P.D., Faucher, S., Slack, R., Anisman, H., Hayley, S., Park, D.S. (2007) Involvement of interferon-gamma in microglial-mediated loss of dopaminergic neurons. *J Neurosci.* 27(12), 3328–3337.
- Moussavi, S., Chatterji, S., Verdes, E., Tandon, A., Patel, V., Ustun, B. (2007) Depression, chronic diseases and decrements in health: Results from the World Health Surveys. *Lancet.* 370(9590), 851–858.
- Müller, N., Schwarz, M.J., Dehning, S., Douhe, A., Ceroveckí, A., Goldstein-Muller, B., Spellmann, I., Hetzel, G., Maino, K., Kleindienst, N., Moller, H.J., Arolt, V., Riedel, M. (2006) The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib has therapeutic effects in major depression: results of a double-blind, randomized, placebo controlled, add-on pilot study to reboxetine. *Mol Psychiatry.* 11, 680–684.
- Müller, N., Schwarz, M.J. (2007) The immune-mediated alteration of serotonin and glutamate: towards an integrated view of depression. *Mol Psychiatry.* 12(11), 988-1000.
- Musselman, D.L., Lawson, D.H., Gumnick, J.F., Manatunga, A.K., Penna, S., Goodkin, R.S., Greiner, K., Nemeroff, C.B., Miller, A.H. (2001) Paroxetine for the prevention of depression induced by high-dose interferon alfa. *N Engl J Med.* 344(13), 961–966.
- Neumeister A. (2003) Tryptophan depletion, serotonin, and depression: where do we stand? *Psychopharmacol Bull.* 37(4), 99–115.
- O'Connor, J.C., André, C., Wang, Y., Lawson, M.A., Szegedi, S.S., Lestage, J., Castanon, N., Kelley, K.W., D'antzer, R. (2009a) Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha mediate the upregulation of indoleamine 2,3-dioxygenase and the induction of depressive-like behavior in mice in response to *bacillus Calmette-Guerin*. *J Neurosci.* 29(13), 4200–4209.

- O'Connor, J.C., Lawson, M.A., Andre, C., Moreau, M., Lestage, J., Castanon, N., Kelley, K.W., Dantzer, R. (2009b) Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase activation in mice. *Mol Psychiatry*. 14(5), 511-22.
- Orsal, A.S., Blois, S.M., Bermpohl, D., Schaefer, M., Coquery, N. (2008) Administration of interferon-alpha in mice provokes peripheral and central modulation of immune cells, accompanied by behavioral effects. *Neuropsychobiology* 58(3-4), 211-222.
- Overstreet, D. (2007) The Open Field Test for two. *J Psychopharmacol*. 21(2), 140.
- Palanza, P. (2001) Animal models of anxiety, depression: how are females different? *Neurosci Biobehav. Rev.* 25(3), 219-233.
- Palin, K., McCusker, R.H., Strle, K., Moos, F., Dantzer, R., Kelley, K.W. (2008) Tumor necrosis factor- α -induced sickness behavior is impaired by central administration of an inhibitor of c-Jun N-terminal kinase. *Psychopharmacology (Berl)*. 197(4), 629-635.
- Parra, A., Vinader-Caerols, C., Monleón, S., Simón, V.M. (1999) Learned Immobility is also involved in the forced swimming test in mice. *Psicothema*. Vol. 11(2), 239-246.
- Pawlak, C., Schwarting, R. (2002) Object preference and nicotine consumption in rats with high versus low rearing activity in a novel open field. *Pharmacol Biochem Behav.* 73(3), 679-687.
- Pecchi, E., Dallaporta, M., Jean, A., Thirion, S., Troadec, J.D. (2009) Prostaglandins and sickness behavior: Old story, new insights. *Physiol Behav.* 22, 97(3-4), 279-92.
- Pechnick, R., Chesnokova, V., Kariagina, A., Price, S., Bresee, C. Poland, R. (2004) Reduced immobility in the Forced Swim Test in mice with a targeted deletion of the leukemia inhibitory factor (LIF). *Neuropsychopharmacology*. 29(4), 770-776.
- Petit-Demoulière, B., Chenu, F., Bourin, M. (2005) Forced swimming test in mice: A review of antidepressant activity. *Psychopharmacology (Berl)*. 177(3), 245-255.
- Picciotto, M.R., Wickman, K. (1998) Using Knockout and Transgenic Mice to Study Neurophysiology and Behavior. *Physiol Rev.* 78(4), 1131-1163.
- Pollak, Y., Yirmiya, R. (2002) Cytokine-induced changes in mood and behaviour: implications for 'depression due to a general medical condition', immunotherapy and antidepressive treatment. *International J Psychopharmacol.* 5(4), 389-399.
- Popa, D., Cerdan, J., Repérant, C., Guiard, B.P., Guilloux, J.-P., David, D.J., Gardier, A.M. (2010) A longitudinal study of 5-HT outflow during chronic fluoxetine treatment using a new technique of chronic microdialysis in a highly emotional mouse strain. *Eur J Pharmacol.* 628(1-3), 83-90.
- Porsolt, R.D., Le Pichon, M., Jalfre, M. (1977a) Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*. 266(5604), 730-2.

- Porsolt, R.D., Bertin, A., Jalfre, M. (1977b). Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 229(2), 327–336.
- Porsolt, R.D., Anton, G., Blavet, N., Jalfre, M. (1978a) Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol.* 47(4), 379-91.
- Porsolt, R.D., Bertin, A., Jalfre, M. (1978b) Behavioural despair in rats, mice: strain differences, the effects of imipramine. *Eur J Pharmacol.* 51(3), 291–294.
- Porsolt, R.D. (2000) Animal models of depression: utility for transgenic research. *Rev Neurosci.* 11(1), 53–58.
- Prut, L., Belzung, C. (2003) The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol.* 463(1-3), 3–33.
- Qin, L., Wu, X., Block, M.L., Liu, Y., Breese, G.R., Hong, J.S., Knapp, D.J., Crews, F.T. (2007) Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia.* 55(5), 453–462.
- Qing, Y., Stark, G.R. (2004) Alternative activation of STAT1 and STAT3 in response to interferon-gamma. *J Biol Chem.* 279(40), 41679-85.
- Raison, C.L., Miller, A. H. (2003) When not enough is too much: the role of insufficient glucocorticoid signaling in the pathophysiology of stress-related disorders. *Am J Psychiatry.* 160(9), 1554–1565.
- Raison, C.L., Capuron, L., Miller, A.H. (2006) Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. *Trends Immunol.* 27(1), 24–31.
- Raison, C.L., Borisov, A.S., Woolwine, B.J., Massung, B., Vogt, G., Miller, A.H. (2008) Interferon-alpha effects on diurnal hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity: Relationship with proinflammatory cytokines and behavior. *Mol Psychiatry.* 15(5), 535-47.
- Raison, C.L., Borisov, A.S., Majer, M., Drake, D.F., Pagnoni, G., Woolwine, B.J., Vogt, G.J., Massung, B., Miller, A.H. (2009) Activation of central nervous system inflammatory pathways by interferon-alpha: relationship to monoamines and depression. *Biol Psychiatry.* 65(4), 296–303.
- Ramana, C.V., Gil, M.P., Schreiber, R.D., Stark, G.R. (2002) Stat1-dependent and -independent pathways in IFN-gamma-dependent signaling. *Trends Immunol.* 23(2), 96-101.
- Ramos, A., Mormède, P. (1998) Stress and emotionality: a multidimensional and genetic approach. *Neurosci Biobehav Rev.* 22(1), 33–57.
- Redrobe, J.P., Bourin, M. (1999) The effect of lithium administration in animal models of depression: a short review. *Fundam Clin Pharmacol.* 13(3), 293-9.
- Reichenberg, A., Yirmiya, R., Schuld, A., Kraus, T., Haack, M., Morag, A., Pollmächer, T. (2001) Cytokine-associated emotional and cognitive disturbances in humans. *Arch Gen Psychiatry.* 58(5), 445–452.
- Ren, S., Li, M., Cai, H., Hudgins, S., Furth P. A. (2001) A simplified method to prepare PCR template

DNA for screening of transgenic and knockout mice. *Contemp Top Lab Anim Sci.* 40(2), 27-29.

Reneric, J.P., Bouvard, M., Stinus, L. (2002) In the rat forced swimming test, chronic but not subacute administration of dual 5-HT/NA antidepressant treatments may produce greater effects than selective drugs. *Behav Brain Res.* 136, 521–532.

Ribeiro, D.E., Maiolini, V.M., Soncini, R., Antunes-Rodrigues, J., Elias, L.L., Vilela, F.C., Giusti-Paiva, A. (2013) Inhibition of nitric oxide synthase accentuates endotoxin-induced sickness behavior in mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 103(3), 535-40.

Ridker, P.M. (2007) Inflammatory biomarkers and risks of myocardial infarction, stroke, diabetes, and total mortality: Implications for longevity. *Nutr Rev.* 65(12 Pt 2), S253-9.

Roche, J.P., Timberlake, W. (1998) The influence of artificial paths and landmarks on the foraging behavior of Norway rats (*Rattus norvegicus*). *Learning & Behavior.* 26(1), 76-84.

Rush, A.J., Trivedi, M.H., Wisniewski, S.R., Nierenberg, A.A., Stewart, J.W., Warden, D., Niederehe, G., Thase, M.E., Lavori, P.W., Lebowitz, B.D., McGrath, P.J., Rosenbaum, J.F., Sackeim, H.A., Kupfer, D.J., Luther, J., Fava, M. (2006) Acute and longer- term outcomes in depressed outpatients requiring one or several treatment steps: a STAR*D report. *Am J Psychiatry.* 163(11), 1905–1917.

Saha, B., Jyothi Prasanna, S., Chandrasekar, B., Nandi, D. (2010) Gene modulation and immunoregulatory roles of interferon gamma. *Cytokine.* 50(1), 1-14.

Saito, V.M., Rodrigues, D.H., Teixeira, A.L., Moreira, F.A. (2010) Role of interferon-gamma on anxiety-like behaviour in mice. *Europ Neuropsychopharmacol.* 20 (3), 284-285.

Sakic, B., Gauldie, J., Denburg, J.A., Szechtman, H. (2001) Behavioral effects of infection with IL-6 adenovector. *Brain Behav Immun.* 15(1), 25–42.

Sams-Dodd, F. (1995) Automation of the social interaction test by a video-tracking system: behavioural effects of repeated phencyclidine treatment. *J Neurosci Methods.* 59(2), 157-67.

Sapolsky, R.M. (2004) Is impaired neurogenesis relevant to the affective symptoms of depression? *Biol Psychiatry.* 56(3), 137–139.

Schaefer, M., Engelbrecht, M.A., Gut, O., Fiebich, B.L., Bauer, J., Schmidt, F., Grunze, H., Lieb, K. (2002) Interferon Alpha (IFN- α) and psychiatric syndromes: a review. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 26(4), 731–46.

Schatzberg, A.F., Schildkraut, J.J. (1995) Recent studies on norepinephrine systems on mood disorders. In: *Psychopharmacology: the fourth generation of progress* (Bloom, F.E., Kupfer, D.J., eds), New York: Raven. 911–922.

Schiepers, O.J., Wichers, M.C., Maes, M. (2005) Cytokines and major depression. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol Psychiatr.* 29(2), 201–217.

- Schildein, S., Huston, J., Schwarting, R. (2002) Open field habituation learning is improved by nicotine and attenuated by mecamylamine administered posttrial into the nucleus accumbens. *Neurobiol Learn Mem.* 77(3), 277-290.
- Schindler, C., Shuai, K., Prezioso, V.R., Darnell, J.E. (1992) Interferon-dependent tyrosine phosphorylation of a latent cytoplasmic transcription factor. *Science.* 257(5071), 809-813.
- Schwarz, S., Hofmann, M., Gutzen, C., Schlax, S., von der Emde, G. (2002) VIEWER: a program for visualising, recording, and analysing animal behaviour. *Comput. Methods Programs Biomed.* 67(1), 55-66.
- Shiutsuki, H., Yoshimi, K., Shimoa, K., Funayama, M., Takamatsu, Y., Ikeda K., Takahashid, R., Kitazawa, S., Hattori, N. (2010) A rotarod test for evaluation of motor skill learning. *J Neuroscience Meth.* 189(2), 180–185.
- Shuai, K., Horvath, C.M., Huang, L.H., Qureshi, S.A., Cowburn, D., Darnell, J.E. (1994) Interferon activation of the transcription factor Stat91 involves dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interactions. *Cell.* 76(5), 821-828.
- Simen, B.B., Duman, C.H., Simen, A.A., Duman, R.S. (2006) TNFalpha signaling in depression and anxiety: behavioral consequences of individual receptor targeting. *Biol Psychiatry.* 59(9), 775–785.
- Smeekeens, S.P., Plantinga, T.S., van de Veerdonk, F.L., Heinhuis, B., Hoischen, A., Joosten, L.A., Arkwright, P.D., Gennery, A., Kullberg, B.J., Veltman, J.A., Lilic, D., van der Meer, J.W., Netea, M.G. (2011) STAT1 hyperphosphorylation and defective IL12R/IL23R signaling underlie defective immunity in autosomal dominant chronic mucocutaneous candidiasis. *PLoS One* 6(12), e29248.
- Smithies, O., Maeda, N. (1995) Gene targeting approaches to complex genetic diseases: Atherosclerosis and essential hypertension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92(12), 5266-5272.
- Stam, R., Croiset, G., Akkermans, L.M., Wiegant, V.M. (1997) Behavioural and intestinal responses to novelty in rats selected for diverging reactivity in the open field test. *Behav Brain Res.* 88(2), 231-8.
- Stanford, S.C. (2006) The Open Field Test: reinventing the wheel. *J Psychopharmacol.* 21(2), 136-9.
- Sugawara, I., Yamada, H., Mizuno, S. (2004) STAT1 knockout mice are highly susceptible to pulmonary mycobacterial infection. *Tohoku J Exp Med.* 202(1), 41–50.
- Takao K, Miyakawa T. (2006) Investigating gene-to-behavior pathways in psychiatric disorders: the use of a comprehensive behavioral test battery on genetically engineered mice. *Ann NY Acad Sci.* 1086, 144-59.
- Takikawa, O., Tagawa, Y., Iwakura, Y., Yoshida, R., Truscott, R.J. (1999) Interferon-gamma-dependent/independent expression of indoleamine 2,3-dioxygenase. Studies with interferon-gamma-knockout mice. *Adv Exp Med Biol.* 467, 553–7.
- Tanti, A., Belzung, C. (2010) Open questions in current models of antidepressant action. *Br J Pharmacol.*

159(6), 1187–1200.

Thiel, C., Muller, C., Huston, J. and Schwarting, R. (1999) High versus low reactivity to a novel environment: behavioural, pharmacological and neurochemical assessments. *Neuroscience*. 93(1), 243–251.

Thierry, B., Steru, L., Chermat, R., Simon, P. (1984) Searching–waiting strategy: a candidate for an evolutionary model of depression? *Behav Neural Biol*. 41(2), 180–189.

Trivedi, M.H., Rush, A.J., Wisniewski, S.R., Nierenberg, A.A., Warden, D., Ritz, L. Norquist, G., Howland, R.H., Lebowitz, B., McGrath, P.J., Shores-Wilson, K., Biggs, M.M., Balasubramani, G.K., Fava, M.; STAR*D Study Team. (2006) Evaluation of outcomes with citalopram for depression using measurement-based care in STAR*D: implications for clinical practice. *Am J Psychiatry*. 163(1), 28–40.

Tsao, C.W., Lin, Y.S., Chen, C.C., Bai, C.H., Wu, S.R. (2006) Cytokines and serotonin transporter in patients with major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 30(5), 899–905.

Tulina, N., Matunis, E. (2001) Control of Stem Cell Self-Renewal in *Drosophila* Spermatogenesis by JAK-STAT Signaling. *Science*. 294(5551), 2546–9.

Tyring, S., Gottlieb, A., Papp, K., Gordon, K., Leonardi, C., Wang, A., Lalla, D., Woolley, M., Jahreis, A., Zitnik, R., Cella, D., Krishnan, R. (2006) Etanercept and clinical outcomes, fatigue, and depression in psoriasis: Double-blind placebo-controlled randomised phase III trial. *Lancet*. 367(9504), 29–35.

Urani, A., Chourbaji, S., Gass, P. (2007) Mutant mouse models of depression: Candidate genes and current mouse lines. *Neurosci Biobehav Rev*. 29(4–5), 805–28.

Vaknin, I., Blinder, L., Wang, L., Gazit, R., Shapira, E., Genina, O., Pines, M., Pikarsky, E., Baniyash, M. (2008) A common pathway mediated through Toll-like receptors leads to T- and natural killer-cell immunosuppression. *Blood*. 111(3), 1437–1447.

Van de Veerdonk, F.L., Plantinga, T.S., Hoischen, A., Smeekeens, S.P., Joosten, L.A., Gilissen, C., Arts, P., Rosentul, D.C., Carmichael, A.J., Smits-van der Graaf, C.A., Kullberg, B.J., van der Meer, J.W., Lilic, D., Veltman, J.A., Netea, M.G. (2011) STAT1 mutations in autosomal dominant chronic mucocutaneous candidiasis. *N Engl J Med*. 365(1), 54–61.

Van Schaik, S.M., Abbas, A.K. (2007) Role of T cells in a murine model of *Escherichia coli* sepsis. *Eur J Immunol*. 37(11), 3101–10.

Varinou, L., Ramsauer, K., Karaghiosoff, M., Kolbe, T., Pfeffer, K., Müller, M., Decker, T. (2003) Phosphorylation of the Stat1 transactivation domain is required for full-fledged IFN-gamma-dependent innate immunity. *Immunity*. 19(6), 793–802.

Vairo, D., Tassone, L., Tabellini, G., Tamassia, N., Gasperini, S., Bazzoni, F., Plebani, A., Porta, F., Notarangelo, L.D., Parolini, S., Giliani, S., Badolato, R. (2011) Severe impairment of IFN- γ and IFN- α responses in cells of a patient with a novel STAT1 splicing mutation. *Blood*. 118(7), 1806–1817.

Vinkemeier, U., Cohen, S.L., Moarefi, I., Chait, B.T., Kuriyan, J., Darnell, J.E. (1996) DNA binding of in

vitro activated Stat1 alpha, Stat1 beta and truncated Stat1: interaction between NH2-terminal domains stabilizes binding of two dimers to tandem DNA sites. *EMBO J.* 15(20), 5616-5626.

Vollmayr, B., Henn, F.A. (2007) Tiermodelle für depressive Störungen. aus: Handbuch der Psychopharmakotherapie. Holsboer, H., Gründer, G., Benkert, O. (eds.) Springer-Verlag.

Walsh, R., Cummins, R. (1976) The open field test: a critical review. *Psychol Bull.* 83(3), 482–504.

Wang, J.Y., Zeng, X.Y., Fan, G.X., Yuan, Y.K., Tang, J.S. (2006) Mu- but not delta- and kappa-opioid receptor mediates the nucleus submedius interferon-alpha-evoked antinociception in the rat. *Neurosci Lett.* 397(3), 254–258.

Wang, J., Dunn, A.J., Roberts, A.J., Zhang, H. (2009) Decreased immobility in swimming test by homologous interferon-alpha in mice accompanied with increased cerebral tryptophan level and serotonin turnover. *Neurosci Lett.* 452(2), 96-100.

Wang, J., Schreiber, R.D., Campbell, I.L. (2002) STAT1 deficiency unexpectedly and markedly exacerbates the pathophysiological actions of IFN-alpha in the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99(25), 16209-14.

Wang, D., An, S.C., Zhang, X. (2008) Prevention of chronic stress-induced depression-like behavior by inducible nitric oxide inhibitor. *Neurosci Lett.* 433(1), 59–64.

West, A.P. (1990) Neurobehavioral studies of forced swimming: the role of learning, memory in the forced swim test. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 14(6), 863–877.

Whitney, N.P., Eidem, T.M., Peng, H., Huang, Y., Zheng, J.C. (2009) Inflammation mediates varying effects in neurogenesis: relevance to the pathogenesis of brain injury and neurodegenerative disorders. *J Neurochem.* 108(6), 1343–1359.

Wichers, M.C., Maes, M. (2004) The role of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) in the pathophysiology of interferon-alpha-induced depression. *J Psychiatry Neurosci.* 29(1), 11–17.

Wichers, M.C., Koek, G.H., Robaey, G., Verkerk, R., Scharpe, S., Maes, M. (2005) IDO and interferon-alpha-induced depressive symptoms: a shift in hypothesis from tryptophan depletion to neurotoxicity. *Mol Psychiatry.* 10(6), 538–544.

Willner, P., Mitchell, P.J. (2002) The validity of animal models of predisposition to depression. *Behav Pharmacol.* 13(3), 169-88.

Wittchen, H.U., Müller, N., Schmidt-kunz, B., Winter, S., Pfister, H. (2000) Erscheinungsformen, Häufigkeit und Versorgung von Depressionen. Ergebnisse des bundesweiten Gesundheitssurveys "Psychische Störungen". *Fortschr Med. (Sonderheft I)*, 4-9

Wu, X., Kastin, A.J., Hsueh, H., Pan, W. (2010) The effects of IL2R γ knockout on depression and contextual memory. *Behav Brain Res.* 213(2), 319-322.

- Xu, X., Sun, Y.L., Hoey, T. (1996) Cooperative DNA binding and sequence-selective recognition conferred by the STAT amino-terminal domain. *Science*. 273(5276), 794-797.
- Yamawaki, Y., Kimura, H., Hosoi, T., Ozawa, K. (2010) MyD88 plays a key role in LPS-induced STAT3 activation in the hypothalamus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 298(2), R403-10.
- Yang, J., Stark, G.R. (2008) Roles of unphosphorylated STATs in signaling. *Cell Res*. 18(4), 443–451.
- Yirmiya, R. (1996) Endotoxin produces a depressive-like episode in rats. *Brain Res*. 711(1-2), 163–174.
- Zhang, H., Tian, Z., Wang, J. (2010) Behavioral evaluation of transgenic mice with CNS expression of IFN- α by elevated plus-maze and Porsolt swim test. *Neurosci Lett*. 479 (3), 287-291.
- Zhong, M., Henriksen, M.A., Takeuchi, K., Schaefer, O., Liu, B., ten Hoeve, J., Ren, Z., Mao, X., Chen, X., Shuai, K., Darnell, J.E. Jr. (2005) Implications of an antiparallel dimeric structure of nonphosphorylated STAT1 for the activation-inactivation cycle. *Proc Natl Acad Sci USA*., 102, 3966-3971.
- Zorilla, E.P., Luborsky, L., McKay, J.R., Rosenthal, R., Houldin, A., Tax, A., McCorkle, R., Seligman, D.A., Schmidt, K. (2001) The relationship of depression and stressors to immunological assays: A meta-analytic review. *Brain Behav Immun*. 15(3), 199 –226.

Verzeichnis akademischer Lehrer

Adamkiewicz	Horn	Nimphius	Wennemuth
Aumüller	Hoyer	Oertel	Werner
Barth	Kalinowski	Olbert	Westermann
Bartsch	Kann	Opitz	Wiegand
Basler	Kaufmann	Pagenstecher	Wilhelm
Bauer	Kerzel	Plant	Wulff
Baum	Kill	Ramaswamy	Yu
Bette	Klenk	Rausch	Zemlin
Bien	Klose	Renz	
Brehm	Köhler	Richter	
Cetin	Koolman	Risse	
Czubayko	Krebber	Röhm	
Daut	Kroll	Rölke	
Del Rey	Krones	Röper	
Donner-Banzhoff	Kuhlmann	Rosenow	
Eberhart	Langer	Rothmund	
Eilers	Lehr	Ruchholtz	
Fendrich	Lill	Schade	
Feuser	Liss	Schäfer	
Geks	Löffler	Schmidt	
Gemsa	Lohoff	Schofer	
Gerdes	Maier	Schrader	
Glorius	Maisch	Schultze	
Görg	Mandrek	Seitz	
Gress	Martin	Sesterhenn	
Grimm	Meyer	Sommer	
Grundmann	Mittag	Sönnichsen	
Grzeschik	Moll	Steiniger	
Hasilik	Moosdorf	Tackenberg	
Hegele	Mueller	Vogelmeyer	
Hertl	Müller	Voigt	
Höffken	Mutters	Wagner	
Hofmann	Neubauer	Waldegger	
Höglinger	Neumüller	Weihe	

Danksagung

An dieser Stelle möchte mich bei einigen Personen bedanken, ohne deren Hilfe und Unterstützung die Anfertigung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Zunächst möchte ich Prof. Dr. Dr. Dr. Thomas Meyer für die Überlassung des Dissertationsthemas danken. Außerdem danke ich für ständige Bereitschaft zur Diskussion der Ergebnisse und Unterstützung bei der Anfertigung der Dissertationsschrift.

Dr. Andreas Borta danke ich für die Einführung in die tierexperimentelle Verhaltensforschung, die Unterstützung bei der statistischen Auswertung und Bereitschaft zur Hilfe bei jeglichen Problemen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Julia Staab für die Durchführung der EMSA-Experimente, die Anleitung bei der Genotypisierung der Versuchstiere und die gute Zusammenarbeit.

Dr. Volker Ruppert bin ich für die Bereitschaft zur Hilfestellung bei labor- und tierexperimentellen Problematiken dankbar.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Uwe Vinkemeier, Universität Nottingham, für die freundliche Überlassung der transgenen Mauslinie für die Untersuchungszwecke.

Robert Rottscholl danke ich für die Bereitstellung des Viewer Automation Tools und die zahlreichen Antworten bei Problem in der Verhaltensfassung.

Marlen Lunow danke ich für die Photographien des Marburger Verhaltenslabors.

Alexander Haussmann und Jacob Bellmund danke ich für die Unterstützung bei statistischen Fragestellungen.

Herrn Prof. Dr. Götz Haussmann danke ich für das Korrekturlesen und die gemeinsame kritische Diskussion der Arbeit.

Zum Schluss möchte noch meiner Familie und meiner Freundin für die moralische und finanzielle Unterstützung danken, die entscheidend zum erfolgreichen Abschluss des Medizinstudiums und der Anfertigung dieser Dissertationsarbeit beigetragen hat.